

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR05/000795

International filing date: 01 April 2005 (01.04.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR  
Number: 0403429  
Filing date: 01 April 2004 (01.04.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 June 2005 (20.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 06 AVR. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)





26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

 0 825 83 85 87  
 0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réserve à l'INPI

## BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*04

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 @ W / 030103

 REMISE DES FACS  
 DATE **1 AVRIL 2004**  
 LIEU **75 INPI PARIS 34 SP**  
 N° D'ENREGISTREMENT  
 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI  
 DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE  
 PAR L'INPI **- 1 AVR. 2004**

0403429

 Vos références pour ce dossier  
 (facultatif) BLO/HLPnd F263/110FR

☒ NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
 À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

 CABINET ORES  
 36, rue de St Petersburg  
 75008 PARIS  
 FRANCE

## Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

## 2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de  
brevet européen *Demande de brevet initiale*☐

N°

Date

## 3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

 ANTIGENE TAT STABILISE ET SES APPLICATIONS POUR LA VACCINATION  
 ANTI-VIH.

 4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ  
 OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE  
 LA DATE DE DÉPÔT D'UNE  
 DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

## 5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale☐ Personne physiqueNom  
ou dénomination sociale

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

Prénoms

Forme juridique

Etablissement Public

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile  
ou  
siège

Rue

31-33 rue de la Fédération

Code postal et ville

75101 PARIS

Pays

FRANCE

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»
Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2

BR2

REMISE DES DOCS  
DATE 14 AVRIL 2004  
LIEU 75 INPI PARIS 34 SP  
N° D'ENREGISTREMENT 0403429  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 191203

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		
Nom	ORES	
Prénom	Béatrice	
Cabinet ou Société	CABINET ORES	
Nationalité		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	36, rue de St Petersburg
	Code postal et ville	75 008 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)	01 53 21 11 00	
N° de télécopie (facultatif)	01 53 21 08 88	
Adresse électronique (facultatif)	ores@cabinet-ores.com	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Choix à faire obligatoirement au dépôt (cf. Notice explicative Rubrique 8)
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) ORES Béatrice N° 92-4046 - Mandataire CABINET ORES		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 

La présente invention est relative à un antigène Tat stabilisé et à ses applications pour la vaccination anti-VIH.

Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) est une maladie sexuellement transmissible provoquée par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH de type 1 (VIH-1) ou de type 2 (VIH-2)). Cette maladie est en progression constante et à ce jour plus de 42 millions de personnes sont infectées dans le monde. C'est pourquoi la mise au point d'un vaccin représente une urgence absolue pour lutter contre cette pandémie.

De nombreuses approches vaccinales ont été développées depuis près de vingt ans sans aboutir à la mise au point d'un vaccin efficace. Cependant, la connaissance toujours plus approfondie du cycle infectieux et des protéines virales responsables de la progression vers le stade SIDA a ouvert la voie vers l'utilisation de nouvelles cibles vaccinales prometteuses : les protéines régulatrices du VIH. Ces protéines, qui avaient tout d'abord été délaissées, font depuis quelques années l'objet de nombreux travaux en raison de leur rôle dans la réplication virale.

Parmi ces protéines, le régulateur transcriptionnel Tat du VIH, représente une cible vaccinale particulièrement intéressante, dans la mesure où l'absence de progression vers le stade SIDA est corrélée à la présence d'anticorps anti-Tat de haut titre et de cellules cytotoxiques spécifiques (Zagury et al., J Hum Virol, 1998, 1 : 282-292 ; Re et al., J Clin Virol, 2001, 21 : 81-89 ; Van Baalen et al., J Gen Virol, 1997, 78: 1913-1918).

Le gène *Tat* comprend 2 exons codant pour une protéine de 99 à 103 acides aminés selon les souches de VIH. L'exon 1 qui code pour les 72 premiers acides aminés, possède une activité de transactivation totale, et comprend 5 domaines : (1) le domaine N-terminal (positions 1 à 21), qui est important pour l'interaction avec des protéines cellulaires, (2) le domaine riche en cystéines (positions 22 à 37) contenant 7 résidus de cystéine fortement conservées (positions 22, 25, 27, 30, 31, 34 et 37), impliqué dans la transactivation, (3) le domaine central (core) correspondant aux positions 38 à 48, également impliqué dans la transactivation, (4) le domaine basique (positions 49 à 57), qui comprend les séquences impliquées dans la localisation nucléaire, le transport transcellulaire et la liaison à l'élément de réponse TAR (*Trans-activation response*) du LTR viral, et qui

est également impliqué dans la liaison de Tat à l'héparine, et (5) le domaine riche en glutamines (positions 50 à 72). L'exon 2 de taille variable, code pour le domaine C-terminal (positions 73 à extrémité C-terminale) qui ne possède pas d'activité de transactivation mais contient le motif RGD (arginine-glycine-aspartate), nécessaire pour la liaison de Tat aux intégrines.

Il existe également une protéine Tat tronquée de 86 acides aminés, produite *in vitro* par génération d'un codon stop en position 87, du fait de la mutation du VIH, lors du passage en culture cellulaire.

Tat est un facteur de transcription essentiel à la réplication virale, (Fisher et al., Nature, 1986, 320:367-371) qui peut à la fois activer le VIH latent et déréguler l'expression d'autres gènes cellulaires, dans la mesure où il possède la particularité d'être libéré par les cellules infectées et incorporé dans d'autres cellules infectées ou non (transport transcellulaire ; Ensoli et al., J Virol, 1993, 67:277-287 ; Chang et al., Aids, 1997, 11:1421-1431). Il a été montré que Tat a des effets toxiques *in vitro*. Ces effets comprennent : la dérégulation des signaux cellulaires impliqués dans l'apoptose, la dérégulation de l'expression de parties de gènes du système immunitaire tel que le gène de l'interleukine 2 et de l'interféron alpha, ou des gènes codant pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II, et/ou l'induction d'angiogénèse. Ainsi, Tat possède de nombreuses activités biologiques et pourrait jouer un rôle, tant dans la dissémination virale que dans la pathogenèse : progression vers le stade SIDA et pathologies associées au SIDA, comme le sarcome de Kaposi.

En conséquence, bien qu'une protéine Tat non-modifiée, biologiquement active soit capable de protéger des singes contre l'infection par le VIH-1 (Cafaro et al., Nat. Med., 1999, 5, 643-650), il n'est pas envisageable d'utiliser une protéine toxique en tant qu'immunogène pour la vaccination humaine.

C'est pourquoi, diverses approches ont été envisagées pour obtenir des dérivés de Tat biologiquement inactifs, qui puissent être utilisés en tant que vaccin chez l'homme.

L'inactivation a principalement porté sur l'élimination de l'aptitude de Tat à transactiver la transcription du génome viral puis sur d'autres activités,

comme l'inhibition de la suppression de la prolifération des cellules T. Ces travaux ont abouti à la découverte de dérivés biologiquement inactifs de Tat, obtenus par :

- mutations dans la séquence du gène *Tat* : (i) délétions des extrémités -NH<sub>2</sub> ou -COOH, ou bien délétion ou substitution des résidus de cystéine  
5 (Demande Internationale WO 95/31999), (ii) substitution conservative de tous les résidus de cystéine du domaine riche en cystéines (cystéine → sérine ; Demande Internationale WO 03/054006), (iii) substitution d'au moins deux résidus d'acide aminé des positions 49 à 72 et/ou 73 à 101, en particulier des positions 49 à 57 (K51T, R52L, R55L, R57L), du domaine RGD (G79A) ou des positions 88 à 92 (K89L, E92Q), et  
10 éventuellement de la cystéine en position 27(C27S), (Demande Internationale WO 03/057885), et (iv) délétion d'un résidu d'acide aminé (C22, T23, N24, Y26, K28/29, C30, C31, F32, K33, E35, F38, K41, Y47, A57) ou substitution d'un résidu d'acide aminé (T23A, N24A, C22G, K41T ; Demande Internationale WO 99/27958),

- traitements chimiques ou physiques de la protéine Tat : (i) traitement  
15 par une aldéhyde comme la formaldéhyde et la glutaraldéhyde (Demande Internationale PCT WO 96/27389), (ii) carboxyméthylation des cystéines à l'aide d'acide iodoacétique ou d'iodoacétamide (Demande Internationale PCT WO 99/33872), et (iii) oxydation, notamment par le peroxyde d'hydrogène ou le periodate de sodium ou bien irradiation (Demande US 20030215797 et Cohen et al., P.N.A.S.,  
20 1999, 96, 10842-10847), et

- purification de la protéine Tat recombinante par un procédé permettant l'élimination de l'ARN et de l'endotoxine contaminants (Demande Internationale PCT WO 03/073984).

Il a en particulier été montré qu'un dérivé de Tat dont les cystéines  
25 22 et 37 sont substituées par des sérines est immunogène (Caselli et al., J. Immunol., 1999, 162, 5631-5638) et qu'un dérivé carboxyméthylé de Tat est immunogène et capable d'induire un ralentissement de la progression de la maladie chez le singe (Pauza et al., P.N.A.S., 2000, 97, 3515-3519).

Ces résultats indiquent qu'un immunogène Tat biologiquement actif  
30 ou préalablement inactivé peut contribuer à la mise en place d'un vaccin anti-VIH efficace. Cependant l'efficacité d'un vaccin dépend en grande partie de sa capacité à induire une forte réponse immunitaire. Or, la molécule Tat est connue pour ses capa-



cités immunosuppressives (Cohen et al., précité) et est faiblement immunogène chez l'animal, en particulier, chez le singe. Ainsi, le ralentissement de la maladie induit par le toxoïde de Tat carboxyméthylé nécessite une série de 5 immunisations (Pauza et al., P.N.A.S., 2000,97, 3515-3519) et la protection procurée par la molécule Tat biologiquement active a été obtenue après une série de 9 à 10 immunisations, selon les protocoles (Cafaro et al., précité).

En conséquence, pour mettre au point un vaccin efficace contre le VIH, il existe un réel besoin de développer un antigène dérivé de Tat présentant une immunogénicité augmentée par rapport à celle des antigènes Tat de l'art antérieur.

Les Inventeurs se sont donnés pour but, la mise au point d'un tel antigène.

Les Inventeurs ont montré que de façon surprenante, la protéine Tat était très instable et rapidement dégradée par les enzymes protéolytiques. La mise en évidence de cette caractéristique de Tat les a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle l'amélioration de la stabilité de Tat devrait diminuer sa susceptibilité protéolytique et augmenter sa demi-vie dans l'organisme, ainsi que son immunogénicité. Cette hypothèse a été validée en comparant l'immunogénicité de Tat non-modifiée à celle de Tat préalablement stabilisée, soit par formation d'un complexe avec un ligand, soit par incorporation de groupements hydrophobes. Par comparaison avec Tat non-modifiée ou un toxoïde de Tat dont les cystéines sont bloquées par des groupements acétamidométhyle qui sont peu immunogènes, les dérivés stabilisés de Tat induisent des titres en anticorps anti-Tat au moins 10 fois plus élevés chez l'animal (facteur 10 à 35) et sont capables d'induire une réponse cellulaire spécifique de Tat. En outre, ces dérivés présentent une activité transactivatrice altérée indiquant une absence de toxicité.

La présente invention a en conséquence pour objet, une composition vaccinale anti-VIH, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un antigène Tat stabilisé.

### Définitions

- On entend par antigène Tat, un monomère ou un oligomère, notamment un dimère d'une protéine Tat ou d'un fragment de cette protéine d'au moins 11 acides aminés, capable d'induire une réponse humorale et/ou cellulaire

spécifique chez un mammifère humain ou animal ; ledit antigène Tat est, soit biologiquement actif, soit inactivé par mutation de la séquence du gène *Tat*, notamment par la substitution en sérine(s), de résidu(s) de cystéine de la région riche en cystéines, ou bien par traitement physique (irradiation) ou chimique (action d'une aldéhyde, oxydation) de Tat, comme défini ci-dessus.

- On entend par oligomère de Tat, l'association de monomères de Tat (protéine et/ou fragment) identiques ou différents entre eux (homo- ou hétéro-oligomères), par une ou plusieurs liaisons covalentes et/ou non covalentes. Les oligomères covalents résultent notamment de la formation de pont(s) disulfure(s) par oxydation de résidus de cystéine ou de la formation d'autre liaison(s) chimique(s) (oxime, hydrazone), ou bien encore de la réaction avec des groupements homobifonctionnels tels que la glutaraldéhyde ou hétéro-bifonctionnels tels que le 3-((2-aminoéthyle)dithio) propionique hydrochloride). Les oligomères non-covalents peuvent être formés par l'intermédiaire de motifs du type leucine-zipper ou de cations polyvalents, de préférence divalents, comme le zinc ou le cadmium.

- On entend par protéine Tat (ou Tat), la protéine Tat de n'importe quelle souche de VIH (VIH-1 ou VIH-2), correspondant à une séquence d'environ 86 à 103 acides aminés, selon les souches.

- On entend par antigène Tat stabilisé, un dérivé de la protéine Tat ou du fragment de Tat tels que définis ci-dessus, comprenant une modification physique ou chimique telle qu'après 2 heures de digestion par la chymotrypsine (rapport enzyme/substrat de 1/50 (P/P)), la proportion de dérivé de Tat reconnue par un anticorps monoclonal anti-Tat dirigé contre l'épitope (KGLGISYGRK) de la région du core est au moins 20% plus importante, de préférence au moins 50 % plus importante, que la proportion de Tat non-modifiée reconnue par le même anticorps, suite à la même digestion enzymatique.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite composition, ledit antigène Tat stabilisé est constitué par :

a) un complexe entre une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés tels que définis ci-dessus, et un ligand de Tat,

b) une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou modifi-

cation par un groupement hydrophobe, d'au moins un acide aminé de la séquence de Tat, à l'exclusion des substitutions R52L, R55L, R57L et K89L, et

c) un complexe entre la protéine Tat ou le fragment de Tat modifiés en b), et un ligand de Tat.

5 Le ligand de Tat est constitué par n'importe quel composé capable de se lier à Tat ou à un fragment de Tat ; il peut être de nature ionique, protéique, lipidique, glucidique, nucléotidique (ADN, ARN) ou mixte (glycolipide, glycoprotéine). Il inclut notamment : les cations polyvalents, de préférence divalents, notamment le zinc et le cadmium ; la protéine Vpr du VIH ; les sucres polysulfatés  
10 comme par exemple : le sulfate de dextran, le pentosane polysulfate et les glycosaminoglycans polysulfatés, notamment l'héparine, l'héparane sulfate et les composés tels que décrits dans Rusnati et al., J. Biol. Chem. 1998, 273, 16027-16037.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation de ladite composition, ledit ligand est une héparine ou un fragment d'héparine ; de préférence, il s'agit d'une héparine de poids moléculaire de 15 000 Da ou d'un fragment  
15 d'héparine de poids moléculaire de 6000 Da, qui se lie à Tat avec une affinité élevée. De préférence, il s'agit d'un complexe équimolaire Tat/héparine.

L'acide aminé hydrophobe qui remplace l'un au moins des acides aminés de Tat est, soit un acide aminé naturel choisi parmi : L (leucine), V (valine), I (isoleucine), A (alanine), M (méthionine), F (phénylalanine), W (tryptophane) ou Y (tyrosine), soit un acide aminé non protéinogénique, dont le carbone portant la chaîne latérale R, à savoir le groupe -CHR-, situé entre -CO- et -NH- dans la chaîne peptidique naturelle, est remplacé par un motif n'entrant pas dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide naturel. A titre d'exemple non-limitatif, on peut citer la  
20 Norleucine (Nle) et la cyclohexaalanine (Cha).

Le groupement hydrophobe qui est introduit sur un acide aminé est un alkyle ou un aryle tel que par exemple : S-tertio-butyle, néopentyle, isobutyle, isopropyle, 1-méthylpropyle, benzyle, indoyle ou un naphthyle. Ledit groupement hydrophobe peut-être introduit sur l'acide aminé à l'aide d'un réactif de type 1-iodo-  
30 2,2-diméthylpropane,  $\alpha$ -bromo-toluène, ter-butyle disulfure, N-ter-Butylacrylamide. Les résidus d'acides aminés de Tat ou du fragment de Tat qui sont modifiés par ledit groupement hydrophobe sont les acides aminés polaires ou chargés qui peuvent être

fonctionnalisés. Parmi ces acides aminés, on peut citer ceux possédant les fonctions réactives suivantes : -OH [sérine (S), thréonine (T) ou tyrosine (Y)], -SH [cystéine (C)], -NH<sub>2</sub> [lysine (K) ou arginine (R)], -COOH [acide aspartique (D) ou acide glutamique (E)].

5 Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de réalisation de ladite composition, ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat sont modifiés par substitution et/ou modification de 1 à 7 cystéines, situées en positions 22, 25, 27, 30, 31, 34 et/ou 37.

10 De préférence, ladite cystéine est modifiée par un groupement S-tertio-butyle (CysStBu) ou substituée par un acide aminé hydrophobe sélectionné dans le groupe constitué par : une leucine, un tryptophane et une phénylalanine. De manière préférée, au moins les quatre cystéines en position 25, 27, 30 et 31 sont substituées par un acide aminé hydrophobe et/ou modifiées par un groupement hydrophobe tel que défini ci-dessus.

15 Selon encore une autre disposition avantageuse des modes de réalisation précédents de ladite composition, ledit antigène Tat selon l'invention dérive d'un antigène Tat inactivé, comprenant de préférence la substitution des cystéines en positions 22, 34 et 37 en sérines. De manière préférée, il s'agit d'un antigène Tat dans lequel les cystéines en positions 22, 34 et 37 sont substituées en sérines et les cystéines  
20 en positions 25, 27, 30 et 31 sont modifiées par un groupement S-tertio-butyle ou substituées par une leucine, un tryptophane ou une phénylalanine. Un tel antigène présente à la fois un pouvoir immunogène élevé et une absence de toxicité, indiquée par une absence de pouvoir transactivateur du LTR viral.

25 Selon encore une autre disposition avantageuse des modes de réalisation précédents de ladite composition, ledit antigène Tat est stabilisé par la combinaison de la formation d'un complexe avec un ligand et la substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou la modification par un groupement hydrophobe, d'au moins un des résidus d'acides aminés de la séquence de Tat, tel que défini ci-dessus. La combinaison des deux modifications permet avantageusement d'obtenir une  
30 augmentation de l'immunogénicité de Tat supérieure (d'au moins un facteur cinq), à celle obtenue avec une seule des modifications.

Selon encore une autre disposition avantageuse des modes de réalisation précédents de ladite composition, ladite protéine Tat ou le fragment de ladite protéine sont choisis parmi : la protéine Tat de 86 acides aminés (Tat86), le fragment 1 à 57 de Tat et les fragments d'au moins 11 acides aminés inclus dans la protéine ou le  
5 fragment précédents, de préférence ceux comprenant de 11 à 50 acides aminés, de manière préférée ceux comprenant entre 11 et 35 acides aminés, de manière encore plus préférée ceux comprenant entre 15 et 25 acides aminés.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition vaccinale, ledit antigène Tat stabilisé dérive de la protéine Tat de SEQ ID NO :1 ou  
10 d'un fragment d'au moins 11 acides aminés de cette protéine.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition vaccinale, ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat sont des monomères.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite  
15 composition, ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat sont des oligomères formés par l'association covalente et/ou non-covalente de monomères de Tat (protéine(s) et/ou fragment(s)), de préférence, il s'agit de dimères. Les oligomères associés de façon covalente comprennent notamment, au moins une liaison disulfure intermoléculaire impliquant un résidu de cystéine de la séquence en acides aminés de  
20 Tat, en particulier une cystéine de la région riche en cystéines, de préférence l'une des cystéines en position 22, 34 ou 37. Conformément à l'invention, l'une au moins des cystéines qui n'est pas impliquée dans un pont disulfure, peut être substituée par un groupement hydrophobe et/ou modifiée par un groupement hydrophobe tel que défini ci-dessus, les cystéines résiduelles étant par exemple substituées en un acide aminé ne  
25 comprenant pas de groupement sulfhydryle comme la sérine. Alternativement, les oligomères peuvent également être associés de façon non-covalente par l'intermédiaire de cations polyvalents, de préférence divalents comme le zinc ou le cadmium.

Les antigènes Tat stabilisés selon l'invention sont notamment représentés par :

30 a) un complexe d'une protéine Tat de 101 acides aminés (Tat101) ou de 86 acides aminés (Tat86) et d'une héparine de poids moléculaire de 15000 Da ou

d'un fragment d'héparine de poids moléculaire de 6000 Da, en particulier un complexe équimolaire Tat/héparine,

b) une protéine Tat de 101 acides aminés (Tat101) ou de 86 acides aminés (Tat86) comprenant une cystéine modifiée par un groupement S-tertio-butyle en positions 22, 25, 27, 30, 31, 34 et 37,

c) une protéine Tat de 101 acides aminés (Tat101) ou de 86 acides aminés (Tat86) comprenant une sérine en positions 22, 34 et 37 et une cystéine modifiée par un groupement S-tertio-butyle en positions 25, 27, 30 et 31,

d) une protéine Tat de 101 acides aminés (Tat101) ou de 86 acides aminés (Tat86) comprenant une leucine, en positions 22, 25, 27, 30, 31, 34 et 37,

e) une protéine Tat de 101 acides aminés (Tat101) ou de 86 acides aminés (Tat86) comprenant une phénylalanine, en positions 22, 25, 27, 30, 31, 34 et 37,

f) une protéine Tat de 101 acides aminés (Tat101) ou de 86 acides aminés (Tat86) comprenant un tryptophane, en positions 22, 25, 27, 30, 31, 34 et 37,

g) un dimère de Tat formé de l'association par un pont disulfure entre les cystéines en position 34, de deux protéines Tat ou de deux fragments de Tat modifiés, comprenant une sérine en positions 22 et 37 et une leucine en positions 25, 27, 30 et 31, et

h) un complexe d'une protéine Tat ou d'un dimère de Tat tel que définis en b), c), d), e), f) ou g) et d'une héparine de poids moléculaire de 15000 Da ou d'un fragment d'héparine de poids moléculaire de 6000 Da, en particulier un complexe équimolaire Tat/héparine.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable, et/ou une substance porteuse, et/ou un adjuvant.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite composition est constituée par un antigène stabilisé tel que défini ci-dessus et un véhicule pharmaceutiquement acceptable, et/ou une substance porteuse.

La composition vaccinale selon l'invention se présente sous une forme galénique adaptée à une administration par voie parentérale (sous-cutanée,

intramusculaire, intraveineuse), entérale (orale, sublinguale), ou locale (rectale, vaginale).

Les véhicules pharmaceutiquement acceptables, les substances porteuses et les adjuvants sont ceux classiquement utilisés.

5 Les adjuvants sont avantageusement choisis dans le groupe constitué par : des émulsions huileuses, des substances minérales, des extraits bactériens, la saponine, l'hydroxyde d'alumine, le monophosphoryl -lipide A et le squalène.

10 Les substances porteuses sont avantageusement sélectionnées dans le groupe constitué par : les liposomes unilamellaires ou multilamellaires, les ISCOMS, les virosomes, les particules de type viral (*virus-like particles*), les micelles de saponine, les microsphères solides de nature saccharidique (poly(lactide-co-glycolide)) ou aurifère, et les nanoparticules.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition vaccinale, elle comprend de l'hydroxyde d'alumine.

15 Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition vaccinale, elle comprend au moins un autre antigène du VIH, notamment Rev, Nef, gag, gp 160 ou un fragment d'au moins 11 acides aminés desdits antigènes.

20 La présente invention a également pour objet un antigène Tat stabilisé tel que défini ci-dessus comme vaccin pour la prévention et/ou le traitement d'une infection par le VIH chez l'homme.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un antigène Tat stabilisé tel que défini ci-dessus, pour la préparation d'un vaccin destiné à la prévention et/ou au traitement d'une infection par le VIH chez l'Homme.

25 La présente invention a également pour objet un complexe peptidique, caractérisé en ce qu'il est constitué par :

- une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou modification par un groupement hydrophobe, d'au moins un acide aminé de la séquence de Tat, tel que défini ci-dessus, associé à

30 - un ligand de Tat, tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une protéine ou un fragment de celle-ci, caractérisés en ce qu'ils sont choisis parmi une protéine Tat de

VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou modification par un groupement hydrophobe, d'au moins un acide aminé de la séquence de Tat tels que définis ci-dessus, à l'exclusion des substitutions R52L, R55L, R57L et K89L.

5 La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'un antigène Tat stabilisé, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

- la préparation, par tout moyen approprié, d'une protéine Tat de VIH ou d'un fragment de Tat tel que défini ci-dessus, et de façon simultanée ou séquentielle,

10 - la formation d'un complexe avec un ligand de Tat tel que défini ci-dessus et/ou la substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou la modification par un groupement hydrophobe, d'au moins un des résidus d'acides aminés de la séquence de Tat, telles que définies ci-dessus, à l'exclusion des substitutions R52L, R55L, R57L et K89L.

15 La présente invention a également pour objet un polynucléotide (ADN ou ARN) ou un mélange de polynucléotides sélectionné dans le groupe constitué par :

a) un polynucléotide ou un mélange de polynucléotides comprenant la séquence codant pour une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11  
20 acides aminés et la séquence codant pour un ligand peptidique de Tat, tels que définis ci-dessus, et

b) un polynucléotide comprenant la séquence codant pour une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe d'au moins un acide aminé de la séquence  
25 de Tat tels que définis ci-dessus, à l'exclusion des substitutions R52L, R55L, R57L et K89L.

Conformément à l'invention les séquences codantes de la protéine Tat et/ou du fragment de ladite protéine et du ligand peptidique de Tat sont incluses dans un polynucléotide unique ou bien dans deux polynucléotides séparés.

30 La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant ou un mélange de deux vecteurs recombinant comprenant un insert constitué



respectivement par, le polynucléotide défini en a) ou en b) et chacun des deux polynucléotides du mélange défini en a).

De préférence, ledit vecteur recombinant est un vecteur d'expression dans lequel ledit ou lesdits polynucléotides sont placés sous le contrôle d'éléments  
5 régulateurs de la transcription et de la traduction appropriés.

La présente invention a également pour objet des cellules procaryotes ou eucaryotes transformées par un vecteur recombinant ou un mélange de vecteurs recombinants tels que définis ci-dessus.

De nombreux vecteurs dans lesquels on peut insérer un  
10 polynucléotide d'intérêt afin de l'introduire et de le maintenir dans une cellule hôte eucaryote sont connus en eux-mêmes ; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple répllication de la séquence d'intérêt, expression de cette séquence, maintien de la séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte),  
15 ainsi que de la nature de la cellule hôte. On peut utiliser entre autres, des vecteurs viraux tels que les adénovirus, les rétrovirus, les lentivirus et les AAV, dans lesquels a été insérée préalablement la séquence d'intérêt.

On peut également introduire lesdits polynucléotides (isolés ou insérés dans un vecteur plasmidique) dans des cellules-hôtes, soit en utilisant des  
20 méthodes physiques telles que l'électroporation ou la microinjection, soit en les associant à toute(s) substance(s) permettant le passage de la membrane plasmique, tels que des transporteurs comme les nanotransporteurs, des liposomes, des lipides ou des polymères cationiques. En outre, on peut avantageusement combiner ces méthodes, par exemple en utilisant l'électroporation associée à des liposomes.

25 Les polynucléotides, les vecteurs recombinants et les cellules transformées tels que définis ci-dessus, sont utiles notamment pour la production des antigènes Tat stabilisés selon l'invention ou comme vaccin pour la prévention et/ou le traitement d'une infection par le VIH chez l'Homme.

Les polynucléotides selon l'invention sont obtenus par les méthodes  
30 classiques, connues en elles-mêmes, en suivant les protocoles standards tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA). Par exemple, ils peuvent être obtenus

par amplification d'une séquence nucléique par PCR ou RT-PCR, par criblage de banques d'ADN génomique par hybridation avec une sonde homologue, ou bien par synthèse chimique totale ou partielle. Les vecteurs recombinants sont construits et introduits dans des cellules hôtes par les méthodes classiques d'ADN recombinant et de génie génétique, qui sont connues en elles-mêmes.

La protéine Tat et ses fragments, ainsi que les complexes peptidiques dérivés et les protéines et les peptides modifiés, tels que définis ci-dessus, sont préparés par les techniques classiques connues de l'Homme du métier, notamment par synthèse en phase solide ou liquide ou par expression d'un ADN recombinant dans un système cellulaire approprié (eucaryote ou procaryote).

De manière plus précise :

- la protéine Tat et ses fragments comprenant des acides aminés modifiés par un groupement hydrophobe sont synthétisés en phase solide, selon la technique Fmoc, originellement décrite par Merrifield et al. (J. Am. Chem. Soc., 1964, 85: 2149-) (1964) et purifiés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse,

- la protéine Tat et ses fragments comprenant des acides aminés substitués par des acides aminés hydrophobes sont produits à partir des ADNc correspondants, obtenus par tout moyen permettant d'introduire des mutations dans une séquence d'ADN, connu de l'homme du métier ; l'ADNc est cloné dans un vecteur d'expression eucaryote ou procaryote et la protéine ou le fragment produits dans les cellules modifiées par le vecteur recombinant sont purifiés par tout moyen approprié, notamment par chromatographie d'affinité, et

- les complexes peptidiques sont préparés par mise en contact du ligand de Tat avec Tat ou un de ses fragments dans des conditions permettant aux deux partenaires d'interagir.

Les antigènes Tat selon l'invention présentent les avantages suivants par rapport aux antigènes de l'art antérieur :

- du fait de leur stabilité accrue, ils sont plus immunogènes ; les titres en anticorps anti-Tat, chez l'animal, sont au moins 10 fois plus élevés que ceux obtenus par immunisation avec Tat non-modifiée ou le toxoïde de Tat dont les cystéines sont bloquées par des groupements acétamidométhyle,

- ils induisent à la fois une réponse humorale et cellulaire ; les études comparatives montrent que dans les mêmes conditions, Tat non-modifiée induit une faible réponse humorale mais n'est pas capable d'induire une réponse cellulaire,

- ils possèdent une altération de leur activité transactivatrice qui  
5 indique une absence de toxicité,

- ils sont homogènes (préparation par des procédés reproductibles) et bien définis.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des  
10 exemples de mise en œuvre de l'antigène Tat stabilisé de la présente invention, ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 illustre l'analyse dichroïque de la structure de Tat86 (■) et Tat101 (●). Chaque spectre est le résultat de quatre mesures dans la région UV lointain (190 nm-250 nm), obtenues à une résolution de 0,2 nm, avec un temps d'inté-  
15 gration de 0,5 sec et une bande passante de 2 nm, sur des échantillons de protéine Tat86 et Tat101 à la concentration de 15  $\mu$ M en tampon phosphate de potassium 5 mM pH 7,0,

- la figure 2 illustre la cinétique de protéolyse de Tat101 ; la protéine Tat101 libre (TAT-101SH ; 10  $\mu$ g/100  $\mu$ l) a été incubée à 37 °C en présence  
20 de trypsine (panneau supérieur) ou de chymotrypsine (panneau inférieur), en tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7 (rapport enzyme/substrat 1/200 (P/P)). Les fragments peptidiques générés à différents temps de digestion (30 sec, 1 min, 2 min, 5 min et 6 min) sont matérialisés par des flèches indiquant les sites de clivage de la trypsine (acides aminés basiques : arginine (R) ou lysine (K)) ou de la chymotrypsine  
25 (acides aminés aromatiques : tyrosine (Y), phénylalanine (F) ou tryptophane (W) puis acides aminés aliphatiques hydrophobes : leucine (L) ou isoleucine (I), dans l'ordre préférentiel décroissant).

- la figure 3 illustre l'analyse comparative par chromatographie liquide haute performance en phase inverse du profil des peptides générés par diges-  
30 tion enzymatique de Tat101 (10  $\mu$ g/100  $\mu$ l) et de chacun des complexes équimolaires Tat101/héparine (correspondant à 10  $\mu$ g de Tat101 dans 100  $\mu$ l). La protéine Tat101 (\*) et les complexes Tat101/Hep 3000 (○), Tat101/Hep 6000 (□) et Tat101/Hep

15000 ( $\blacktriangle$ ) ont été incubés pendant 15 min à 37 °C en présence de trypsine, en tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7 (rapport enzyme/substrat 1/200 (P/P)). La flèche indique la position de Tat101 non-dégradée,

5 - la figure 4 illustre l'analyse comparative en ELISA, de l'immuno-génicité de Tat101, Tat101/Hep15000 et Tat101/Hep6000 chez la souris BALB/c. Les valeurs indiquées correspondent à l'inverse du titre en anticorps, mesuré 14 jours et 28 jours après la dernière immunisation,

10 - la figure 5 représente le profil antigénique des sérums produits par immunisation de souris BALB/c avec Tat101(A) et Tat101/Hep6000 (B). Les sérums sont testés en ELISA vis-à-vis de 18 peptides chevauchants d'une longueur de 15 acides aminés, représentant la totalité de la séquence de Tat (peptides 1 à 18). Les valeurs d'absorbance sont exprimées en milli-unités de densité optique (mUDO),

15 - la figure 6 représente la cartographie peptidique des fragments générés par digestion avec la pronase E, de Tat86 libre (TAT86: panneau inférieur) ou Tat86 modifiée par des groupements S-tertiobutyle (TAT86 C(22-37)StBu : panneau supérieur). La digestion est réalisée 15 min à 37°C en tampon phosphate de potassium 50 mM, pH7, avec un rapport enzyme/substrat de 1/20 (P/P) et un substrat Tat à la concentration finale de 10 µg/20 µl,

20 - la figure 7 représente la cartographie peptidique des fragments générés par digestion avec la pronase E, de Tat101 libre (TAT101: panneau inférieur) ou Tat101 modifiée par des groupements S-tertiobutyle (TAT101 C(22-37)StBu : panneau supérieur). La digestion est réalisée 15 min à 37°C en tampon phosphate de potassium 50 mM, pH7, avec un rapport enzyme/substrat de 1/20 (P/P) et un substrat Tat à la concentration finale de 10 µg/20 µl,

25 - la figure 8 illustre l'analyse comparative en ELISA, de l'immuno-génicité de Tat101 et Tat101C(22-37)StBu chez la souris BALB/c. Les valeurs indiquées correspondent à l'inverse du titre en anticorps, mesuré 25 jours, 35 jours et 47 jours après la dernière immunisation,

30 - la figure 9 illustre l'analyse comparative en ELISA, de l'immuno-génicité de Tat86, Tat86C(22-37)StBu, Tat86C(22-37)L et d'un toxoïde de Tat préparé par carboxamidation (Tat86C(22-37)Scam) chez la souris BALB/c. Les

valeurs indiquées correspondent à l'inverse du titre en anticorps, mesuré 14 jours et 28 jours après la dernière immunisation.

- la figure 10 illustre l'analyse comparative en ELISA, de l'immunogénicité des dérivés Tat86C(22-37)S, Tat86C(22-37)F, Tat86C(22-37)W et  
5 Tat86C(22-37)L chez la souris BALB/c. Les valeurs indiquées correspondent à l'inverse du titre en anticorps, mesuré 14 jours et 28 jours après la dernière immunisation

- la figure 11 illustre l'analyse comparative en ELISA, de la liaison de Tat86, Tat86C(22-37)StBu et Tat86C(22-37)L, à l'héparine 6000. Les valeurs  
10 d'absorbance sont exprimées en milli-unités de densité optique (mUDO),

- la figure 12 illustre l'analyse comparative en ELISA, de l'immunogénicité de Tat86C(22-37)StBu et Tat86C(22-37)L, sous forme libre ou complexée à l'héparine. Les valeurs indiquées correspondent à l'inverse du titre en anticorps, mesuré 14 jours et 28 jours après la dernière immunisation.

- la figure 13 illustre l'analyse en ELISA, de l'immunogénicité de  
15 Tat101/Hep6000, Tat101C(22,34,37)S,C(25,27,30,31)StBu/Hep6000, Tat86/Hep6000, Tat86C(22-37)StBu/Hep6000 et Tat86C(22-37)L/Hep6000, en l'absence d'adjuvant, chez la souris SWISS (non-consanguine). Les valeurs indiquées correspondent à l'inverse du titre en anticorps, mesuré 14 jours après la dernière  
20 immunisation.

- la figure 14 illustre la réponse cellulaire induite par immunisation avec Tat86 (A), Tat86C(22-37)StBu (B) et Tat86C(22-37)StBu/Hep6000 (C). L'incorporation de thymidine tritiée par les splénocytes des souris immunisées a été mesurée après stimulation avec des concentrations croissantes de Tat (0,01 à 0,5  $\mu$ M).

- la figure 15 (A, B et C) illustre la diminution du pouvoir  
25 transactivateur des dérivés de Tat. Des cellules Hela transfectées par un plasmide rapporteur contenant le gène de la GFP sous le contrôle transcriptionnel du LTR du VIH-1 ont été incubées en présence de chloroquine et de Tat ou de dérivés de Tat.

### **Exemple 1 : Préparation de Tat et de ses dérivés**

30 La protéine Tat correspond à celle de l'isolat NDK du VIH-1 (Groenink et al., J. Virol., 1991, 65, 1968-1975), dont la séquence est présentée à la figure 2 (SEQ ID NO : 1). Cette protéine est dénommée ci-après Tat101. Par analogie,

le fragment 1 à 86 de cette protéine, est dénommé ci-après Tat86 (SEQ ID NO : 2). L'isolat NDK du VIH-1 (SEQ ID NO : 1) représente la séquence consensus obtenue à partir de 66 séquences d'isolats primaires de VIH-1 rapportées dans les bases de données SWISSPROT et TrEMBL entre 1999 et 2000.

#### 5 1) Synthèse chimique de Tat et de ses dérivés S-tertio-butyle (TatStBu)

La synthèse chimique de Tat est réalisée en phase solide sur un appareil APPLIED BIOSYSTEMS 433A, en utilisant la stratégie Fmoc/tert-butyle connue de l'Homme du métier. Les sept résidus de cystéine de la région riche en cystéines sont protégés par un groupement S-tertio-butyle (S(tBu)). Brièvement, l'échelle de synthèse est de 1 mM, soit 500 mg de résine Fmoc-Asp(OtBu)-PAL-PEG-PS à 0,2 mmol/g pour Tat101, et 476 mg de résine Fmoc-Glu(OtBu)-PAL-PEG-PS à 0,21 mmol/g pour Tat86. 1 mM de chaque acide aminé protégé est utilisé à chaque cycle de couplage. L'activation de chaque acide aminé Fmoc est réalisée en utilisant le couple dicyclohexylcarboïmide/1-hydroxy-7azabenzotriazole ; le couplage est réalisé en présence de 0,25M diisopropyléthylamine/N-méthyle pyrrolidone. Le clivage de la résine et la déprotection (1 h et 30 min) sont réalisés en mélangeant la résine séchée (sous vide pendant une nuit), à 10 ml d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA : 9,5)/triisopropylsilane (0,25)/eau (0,25 ; V/V/V). Après filtration sur fritté, le mélange réactionnel est précipité dans 100 ml de ter-butyle méthyle éther refroidi (4° C), centrifugé 15 minutes à 2500 tours/min. Le solide obtenu est dissous dans 50 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique à 15 %, puis lyophilisé. Le brut de synthèse obtenu est purifié par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse, sur une colonne semi-préparative C4 (21x 250 mm, 5 µM, 300 Å JUPITER). La fraction homogénéisée pour chaque dérivé synthétisé (Tat86C(22-37)StBu et Tat101C(22-37)StBu) est caractérisée, par sa composition en acides aminés et par spectrométrie de masse.

Une stratégie similaire a été utilisée pour produire un dérivé de Tat101 dans lequel les cystéines 22, 34 et 37 sont remplacées par des sérines et les cystéines 25, 27, 30 et 31 sont protégées par un groupement S-tertio-butyle (Tat101C(22,34,37)S,C(25,27, 30, 31)StBu).

Tat86 et Tat101 sont obtenus à partir des dérivés précédents (Tat86C(22-37)StBu et Tat101C(22-37)StBu), par déprotection des groupements

StButyle. Brièvement, 1 équivalent de protéine et 50 équivalents de dithiothréitol par cystéine, sont dissous dans un tampon phosphate de sodium dégazé à 50 mM, pH 8,5, 6M urée, pour une concentration finale de  $10^{-4}$ M. L'avancement réactionnel est suivi par chromatographie liquide haute performance (CHLP) en phase inverse, sur une  
5 colonne analytique C4 (15 cm x 416 mm, 5  $\mu$ M, 300 Å JUPITER). Après 2 heures, la réaction apparaît quantitative, le mélange réactionnel est acidifié jusqu'à pH 2 avec une solution aqueuse de TFA/H<sub>2</sub>O (50/50 ; V/V), puis diluée avec une solution aqueuse de TFA/H<sub>2</sub>O (1/999 ; V/V) dans un volume final de 50 ml. Le mélange réactionnel est alors purifié par chromatographie liquide haute performance (CHLP) en  
10 phase inverse, sur une colonne semi-préparative C4 (25 cm x 10 mm, 5  $\mu$ M, 300 Å JUPITER). La fraction homogénéisée pour chaque dérivé synthétisé (Tat86 et Tat101) est caractérisée, par sa composition en acides aminés, par spectrométrie de masse.

Une stratégie similaire à celle utilisée pour Tat101 et Tat86 a été utilisée pour synthétiser :

- 15 - 18 peptides chevauchants d'une longueur de 15 acides aminés, couvrant la séquence de Tat101, et
- les dérivés de Tat86 dans lesquels chacune des sept cystéines de la région riche en cystéine est substituée en sérine (Tat86Ser, contrôle) ou en un acide aminé hydrophobe, tel qu'une leucine (Tat86C(22-37)), une phénylalanine  
20 (Tat86C(22-37)F) ou un tryptophane (Tat86C(22-37)W).

## 2) Production de la protéine Tat recombinante et des mutants dérivés

La production de la protéine Tat recombinante (Tat86 et Tat101) et de ses mutants a été réalisée chez *E. coli*. Brièvement, la séquence nucléotidique de la protéine Tat a été reconstituée à partir de 8 amorces nucléotidiques synthétiques  
25 chevauchantes, représentant la séquence de la totalité du gène *Tat* codant pour la protéine précitée, flanquée des sites de restrictions *Nde* I et *Hind* III. Les amorces ont été hybridées par leurs régions complémentaires puis le produit d'hybridation obtenu a été amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), à l'aide des amorces ci-dessus, correspondant aux extrémités 5' et 3' du gène *Tat*, flanquées des sites de  
30 restrictions *Nde* I ou *Hind* III. Le fragment d'amplification PCR a ensuite été cloné dans le vecteur d'expression procaryote pET3a (NOVAGEN) et la protéine Tat a été exprimée dans *E. coli* à partir du vecteur recombinant ainsi obtenu, selon les proto-

coles standards recommandés par le fournisseur. La protéine Tat recombinante a été purifiée par passage sur une colonne d'héparine puis par chromatographie à haute pression en phase inversée, selon les protocoles standard de chromatographie.

Alternativement le gène *Tat* a été cloné dans le plasmide pTriEx-1 (NOVAGEN) qui permet l'expression de Tat dans *E. coli*, dans des cellules d'insectes ou des cellules de mammifères sous le contrôle, respectivement, du promoteur T7, du promoteur p10, et d'un promoteur hybride entre l'activateur du promoteur précoce du cytomégalo virus et le promoteur de la  $\beta$ -actine de poulet.

Une stratégie similaire a été utilisée pour produire des mutants de Tat86 dans lesquels chacune des sept cystéines de la région riche en cystéine est substituée en sérine (Tat86Ser, contrôle) ou en un acide aminé hydrophobe, tel qu'une leucine (Tat86C(22-37)).

### 3) Préparation de Tat complexée à l'héparine ou à des cations polyvalents, de préférence divalents ( $Zn^{2+}$ )

L'héparine (poids moléculaire 15000 ; H3393 (SIGMA)) et ses fragments de poids moléculaire 6000 (H5284, SIGMA) et 3000 (H3400, SIGMA) ont été mélangés avec Tat101 ou Tat86 en tampon PBS, dans un rapport molaire Tat/héparine de 1/1, et les complexes ont été incubés à 20°C pendant un temps compris entre 1 heure et une nuit. Les complexes obtenus à partir de Tat101 sont dénommés Tat101/Hep3000, Tat101/Hep6000 et Tat101/Hep15000, et de même pour Tat 86. Des complexes entre Tat101 ou Tat86 et des cations divalents (ions  $Zn^{2+}$ ) ont été préparés de façon similaire, en utilisant un tampon dont le pH est d'environ 6 à 9.

### 4) Préparation d'oligomères de Tat

Des dimères covalents de Tat ont été préparés par oxydation des résidus de cystéine. De manière plus précise, un dérivé monomérique de Tat comme par exemple le dérivé Tat101C(22-31 ; 37)S, a été dissous en tampon phosphate de sodium 50 mM, pH8 (concentration finale  $10^{-4}M$ ). La solution a été incubée pendant 48 heures à température ambiante (environ 20 °C), sous agitation. Le milieu réactionnel a ensuite été acidifié jusqu'à pH2 avec une solution contenant du TFA (TFA/H<sub>2</sub>O, 1/1, v/v). Le dimère de Tat a enfin été purifié par chromatographie liquide haute performance en phase inverse à l'aide d'une colonne analytique C4 (15cmx4,6mm,



5  $\mu\text{M}$ , 300 Å, JUPITER). La nature dimérique du dérivé de Tat a été vérifiée par analyse en acides aminés et spectrométrie de masse.

**Exemple 2 : Tat est structurellement flexible et particulièrement sensible à la dégradation protéolytique.**

5 **1) Matériels et méthodes**

a) Préparation de Tat

Tat86 et Tat101 sont produites par synthèse chimique ou par les techniques d'ADN recombinant, comme décrit à l'exemple 1.

b) Analyse de la susceptibilité de Tat101 à la protéolyse

10 La protéine Tat101 a été dissoute extemporanément en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,0, à la concentration finale de 0,1g/L, puis incubée à 37°C avec l'enzyme (trypsine ou chymotrypsine, ROCHE DIAGNOSTICS GmbH), dans un rapport enzyme/substrat de 1/200 (P/P). A différents temps d'incubation (30 sec, 1 min, 2 min, 5 min, 6 min), 5  $\mu\text{l}$  de TFA 5% ont été ajoutés pour  
15 arrêter la digestion enzymatique, et les fragments peptidiques produits ont été identifiés par chromatographie liquide couplée en ligne à la spectrométrie de masse (ESI-MS, Quattro II, MICROMASS).

c) Analyse dichroïque des protéines Tat86 et Tat101

20 Les mesures en dichroïsme circulaire ont été effectuées à l'aide d'un dichrographe (CD6, YVON JOBIN), à température ambiante. Les solutions d'échantillons à 15  $\mu\text{M}$  en tampon phosphate de potassium 5 mM pH 7,0 ont été préalablement filtrées sur membranes 0,45  $\mu\text{m}$ , avant transfert dans des cuves en quartz de 2 mm de trajet optique. Chaque spectre est le résultat de quatre mesures dans la région UV lointain (190 nm-250 nm), obtenues à une résolution de 0,2 nm, avec un temps  
25 d'intégration de 0,5 sec et une bande passante de 2 nm.

**2) Résultats**

30 Les études de dichroïsme circulaire montrent que les protéines Tat86 et Tat101 sont toutes deux dépourvues de structure secondaire (figure 1) et indiquent qu'elles adoptent une structure flexible, dépourvue de feuillet  $\beta$  et d'hélice  $\alpha$ . La faible organisation structurale d'une protéine induit une flexibilité importante et par voie de conséquence une faible stabilité thermodynamique et une forte susceptibilité à la protéolyse. Ce qui est le cas de la protéine Tat, puisqu'elle est particulièrement

sensible à la dégradation protéolytique. En effet, l'analyse effectuée avec la protéine Tat de 101 acides aminés montre qu'elle subit une première coupure après seulement 30 secondes d'incubation à 37°C avec la trypsine ou la chymotrypsine (figure 2).

Les inventeurs ont émis l'hypothèse que l'amélioration de la stabilité de Tat devrait diminuer sa susceptibilité protéolytique et augmenter sa demi-vie dans l'organisme, ainsi que son immunogénicité. Cette hypothèse a été validée en comparant l'immunogénicité de Tat non-modifiée à celle de molécules Tat préalablement stabilisées. La stabilisation de Tat a été entreprise, soit par complexation avec un ligand, soit par incorporation de groupements hydrophobes.

### 10 **Exemple 3 : Stabilisation de Tat par formation de complexes entre Tat101 et un ligand de Tat (héparine, $Zn^{2+}$ )**

#### **1) Matériels et méthodes**

##### a) Production de complexes Tat/ligand

Les protéines Tat86 et Tat101, libres ou complexées à l'héparine ou bien à des ions  $Zn^{2+}$  sont produites comme décrit à l'exemple 1.

##### b) Analyse de la susceptibilité de Tat101 et de Tat101/héparine à la dégradation protéolytique

L'analyse est effectuée dans les conditions décrites à l'exemple 2, à l'exception de la durée d'incubation avec la trypsine qui est de 15 min et de la concentration en protéine Tat qui est de 0,5 g/L.

##### d) Analyse de la réponse anticorps induite par Tat et les complexes Tat/ligand, chez l'animal

L'analyse de la réponse anticorps induite par Tat et ses dérivés a été effectuée chez la souris BALB/c et la souris SWISS (non-consanguine). Les différents immunogènes ont été mélangés à volume égal avec de l'hydroxyde d'alumine puis injectés, par voie intrapéritonéale, à raison de 5 µg de protéine Tat par souris BALB/c, dans un volume final de 100 µl. Les souris ont été immunisées deux fois à 14 jours d'intervalle. Un prélèvement sanguin a été effectué 14 et 28 jours après la seconde immunisation.

Alternativement, des souris SWISS ont été immunisées avec Tat et ses dérivés, en l'absence d'adjuvant, par voie sous-cutanée, à raison de 16 µg de protéine Tat par souris, dans un volume final de 100 µl. Les souris ont été immuni-

sées deux fois à 14 jours d'intervalle. Un prélèvement sanguin a été effectué 14 jours après la seconde immunisation.

Les sérums ont ensuite été testés pour la présence d'anticorps anti-Tat par un test immunoenzymatique (ELISA). Dans ces expériences, Tat a préalablement été adsorbé sur des plaques ELISA. Les plaques ELISA ont été saturées avec de la sérum albumine bovine à 0,1%. Des dilutions de sérums ont enfin été incubées sur les plaques pendant une nuit à 4°C. La présence d'anticorps anti-Tat a été révélée à l'aide d'un anticorps de chèvre spécifique des anticorps de souris couplé à la peroxydase et de l'ABTS comme substrat.

10 c) Profil antigénique des sérums produits par immunisation avec Tat101 et Tat101/Hep6000.

Ce profil a été établi à l'aide d'un test immunoenzymatique. 18 peptides chevauchants d'une longueur de 15 acides aminés, représentant la totalité de la séquence de Tat, ont été synthétisés en phase solide, comme décrit à l'exemple 1. Les peptides ont ensuite été adsorbés sur des puits de plaque ELISA (10µg/100µl/puits). Les plaques ELISA ont été saturées avec 0,1% de sérum albumine bovine. Des dilutions des échantillons de sérums anti-Tat101 et Tat101 /héparine6000 à tester, ont ensuite été ajoutés dans les plaques et l'incubation a été poursuivie une nuit à 4°C. La présence d'anticorps anti-Tat a ensuite été révélée à l'aide d'un anticorps de chèvre spécifique des anticorps de souris couplé à la peroxydase et de l'ABTS comme substrat.

## 2) Résultats

a) La formation de complexes entre Tat et un ligand de Tat 101 permet d'accroître la stabilité de Tat101 vis-à-vis de la protéolyse.

25 Trois types de complexes Tat/héparine avec un rapport molaire Tat/ligand de 1/1, ont été préparés à partir de Tat101 et des héparines de masse moléculaire 15000, 6000 et 3000 qui présentent une affinité décroissante pour la protéine. L'analyse comparative de la susceptibilité à la protéolyse, de la protéine Tat libre et de la protéine Tat complexée, montre que Tat libre est complètement dégradée en 15 minutes alors qu'elle est dégradée plus lentement lorsqu'elle est complexée (figure 3). Le fragment héparine 3000 de faible affinité protège assez peu Tat, alors que l'héparine 15000 et le fragment d'héparine 6000, plus affins, protègent mieux la protéine

(figure 3). Ainsi, la formation de complexes entre Tat et l'héparine ou des fragments d'héparine permet de stabiliser Tat vis-à-vis de la dégradation protéolytique. Dans une moindre mesure, la formation de complexes entre Tat et le  $Zn^{2+}$  permet également de stabiliser Tat vis-à-vis de la dégradation protéolytique (Tableau I : voir exemple 6, Résultats).

b) La formation de complexes entre Tat et l'héparine permet d'augmenter la réponse humorale induite contre Tat.

La réponse en anticorps anti-Tat induite par immunisation de souris BalB/c avec, soit Tat101 mélangé à de l'hydroxyde d'alumine, soit des complexes Tat101/Hep15000 ou Tat101/Hep6000, mélangés à de l'hydroxyde d'alumine, a été analysée par ELISA. Les résultats montrent que la réponse humorale est augmentée quand Tat101 est préalablement complexée à l'héparine 15000 ou 6000 (figure 4) ; les titres en anticorps induits par Tat101 sont dix fois inférieurs à ceux induits par Tat101/Hep15000 et Tat101/Hep6000.

Des expériences analogues, réalisées chez des souris SWISS et en l'absence d'adjuvant, montrent que les complexes Tat/héparine (Tat101/Hep6000 et Tat86/Hep6000) sont également capables d'induire une réponse immune chez une population non-consanguine, et ce en l'absence d'adjuvant (figure 13).

En outre, dans la mesure où l'interaction avec le ligand héparine pourrait masquer certains sites antigéniques de Tat et en démasquer d'autres, et induire une réponse humorale contre des déterminants qui ne sont pas ceux naturellement présentés par la protéine Tat libre, la spécificité antigénique des anticorps produits contre Tat101 et Tat101/Hep6000 a été analysée en ELISA. Pour ce faire, les sérums des souris immunisés avec Tat101 et Tat101/Hep6000 ont été incubés en présence d'une série de 18 peptides chevauchants d'une longueur de 15 acides aminés représentant l'intégralité de la séquence de Tat.

Les résultats présentés à la figure 5 montrent que la spécificité antigénique des anticorps anti-Tat produits par immunisation avec Tat101/Hep6000 est similaire à celle produite par immunisation avec Tat101 libre.

En effet, l'immunisation avec Tat101 induit de façon prédominante, des anticorps dirigés contre la région 1-15 (titre > 1/3000), et plus faiblement contre les régions 71-90 et 86-101 (titres < 1/400). Les sérums issus de l'immunisation avec

Tat101/héparine présentent le même profil antigénique. De plus, dans les deux cas, la région immunodominante est localisée dans la région N-terminale. La complexation de Tat à l'héparine 6000 permet d'accroître l'intensité de la réponse humorale sans modifier la spécificité antigénique des anticorps anti-Tat produits.

5 **Exemple 4 : Stabilisation de Tat par incorporation de groupements hydrophobes**

**1) Matériels et méthodes**

a) Production de Tat et de ses dérivés

10 Tat et ses dérivés dans lesquels les résidus de cystéine sont bloqués à l'aide de groupements hydrophobes du type S-tertio-butyle (StBu), sont synthétisés en phase solide, comme décrit à l'exemple 1.

b) Analyse de la susceptibilité de Tat86 et Tat86C(22-37)StBu à la dégradation protéolytique

15 Les protéines Tat86 et Tat86C(22-37)StBu ont été dissoutes extemporanément en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,0, à la concentration finale de 0,5 g/L en protéine Tat, puis incubées à 37°C avec la pronase E (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH), dans un rapport enzyme/substrat de 1/20 (P/P) Après 15 min d'incubation, 5µl de TFA 5 % ont été ajoutés pour arrêter la digestion enzymatique, et les fragments peptidiques produits ont été identifiés par chromatographie liquide couplée en ligne à la spectrométrie de masse (ESI-MS, Quattro II, 20 MICROMASS).

c) Analyse de la réponse anticorps induite par Tat86 et Tat86C(22-37)StBu, chez l'animal

25 Cette analyse a été effectuée comme décrit à l'exemple 3 pour les complexes Tat/héparine, à l'exception que les sérums ont été prélevés, soit 14 et 28 jours (figure 9), soit 25, 35 et 47 jours (figure 8) après la dernière immunisation.

d) Analyse de la réponse cellulaire induite par Tat et ses dérivés

30 Les différents immunogènes ont été préparés et injectés selon le même protocole que celui décrit pour l'induction de la réponse humorale (exemple 3). Dix jours après la seconde immunisation, les rates des animaux ont été prélevées et dilacérées. Les splénocytes de souris ont ensuite été incubés en présence de séries de dilution de Tat86. Après 3 jours de stimulation à 37°C, de la thymidine tritiée a été ajoutée, et 18 heures plus tard, les cellules ont été prélevées et la prolifération

cellulaire a été évaluée par mesure de la radioactivité incorporée, selon les protocoles standards.

e) Analyse de la liaison à l'héparine de Tat et de ses dérivés hydrophobes

Les antigènes Tat86, Tat86C(22-37)L et Tat86C(22-37)StBu ont été  
5 adsorbés dans les puits d'une plaque ELISA (0,1 µg/puits). Les plaques ont ensuite été saturées avec du tampon phosphate 0,1 M pH 7, contenant 0,3 % de sérum albumine bovine. Des séries de dilutions d'un conjugué héparine-albumine-biotine, ont ensuite été ajoutées dans les puits. Après une incubation d'une nuit à 4°C, la quantité du  
10 conjugué-héparine albumine-biotine liée à Tat 86 ou à ses dérivés a été révélée à l'aide de streptavidine couplée à la peroxydase puis d'ABTS comme substrat.

**2) Résultats**

a) Le blocage des cystéines de Tat par des groupements StBu permet d'accroître la stabilité d'une grande partie de la séquence de Tat.

Dans une seconde approche, la protéine Tat a été stabilisée par  
15 incorporation de groupements hydrophobes, dans le but de créer un coeur stabilisant. Les 7 cystéines localisées entre le résidu en position 22 et le résidu en position 37 de la région riche en cystéine de Tat ont été modifiées à l'aide de groupements hydrophobes du type S-tertio-butyle (StBu). Pour évaluer les effets de ce type de modification sur la stabilité de Tat, une protéine Tat86 dont les 7 cystéines sont bloquées par  
20 des groupements StBu (Tat86C(22-37)StBu) et une autre dont les cystéines sont libres (Tat86) ont été synthétisées. De la même manière, une protéine Tat101 avec les cystéines libres (Tat101) et une protéine Tat101 avec les cystéines bloquées par des StBu (Tat101C(22-37)StBu) ont également été synthétisées. L'analyse comparative de la stabilité de ces quatre protéines vis-à-vis de l'action protéolytique de la pronase  
25 montre des différences importantes entre les fragments issus de la protéolyse de chacune des quatre protéines (figures 6 et 7). Ainsi, les fragments issus de Tat101 et Tat86 sont pour la plupart de petite taille alors que ceux issus de Tat101C(22-37)StBu et Tat86C(22-37)StBu sont majoritairement de grande taille. Ces résultats indiquent que les protéines Tat dont les cystéines sont libres sont protéolysées de façon exten-  
30 sive, alors que celles dont les cystéines sont bloquées par des groupements hydrophobes sont partiellement protégées de l'action enzymatique. La présence, dans le produit de digestion de Tat101C(22-37)StBu et Tat86C(22-37)StBu de nombreux

longs fragments dans la région s'étendant de l'acide aminé 13 à l'acide aminé 52 et de plusieurs longs fragments dans la région C terminale indique que la protection vis-à-vis de l'action enzymatique s'exerce dans la région d'insertion des groupements hydrophobes mais aussi à distance de celle-ci.

- 5 b) Le blocage des cystéines de Tat par des groupements hydrophobes du type StBu permet d'accroître la réponse humorale dirigée contre Tat.

Dans un premier temps, l'effet de l'incorporation de groupements StBu sur l'immunogénicité de la forme longue de Tat (Tat101) a été évalué. Les résultats montrent que Tat101 induit une réponse anticorps qui est 15 fois plus faible  
10 que celle induite par Tat101C(22-37)StBu (figure 8). L'analyse comparative de l'immunogénicité de la forme courte de Tat (Tat86), de Tat86C(22-37)StBu et d'un toxoïde de Tat préparé par carboxamidation (Tatcam) montre que Tat86C(22-37)StBu induit une réponse anticorps qui est plus de 30 fois supérieure à celle procurée par Tat86 et dix fois plus importante que celle induite par le toxoïde Tatcam (figure 9).  
15 Ainsi, l'incorporation de groupements StBu permet d'accroître significativement l'immunogénicité de Tat101 et de Tat86.

Des expériences analogues, réalisées chez des souris SWISS et en l'absence d'adjuvant, montre que les dérivés TatStBu sont également capables d'induire une réponse immune chez une population non-consanguine, et ce en  
20 l'absence d'adjuvant (figure 13).

- c) les groupements hydrophobes incorporés dans Tat sont responsables de l'augmentation de l'immunogénicité

Le rôle de groupements hydrophobes dans l'augmentation de l'immunogénicité de Tat a été démontré par l'étude de l'immunogénicité d'une  
25 molécule Tat86 dont les 7 cystéines sont substituées respectivement par des leucines (Tat86 C(22-37)L, des phénylalanines (Tat8C(22-37)F), ou des tryptophanes (Tat86 C(22-37)W), par comparaison à une molécule Tat dont les 7 cystéines sont remplacées par des sérines (Tat86C(22-37)S), (figure 10).

- d) La combinaison de la complexation à l'héparine et la création d'une zone hydrophobe augmentent l'immunogénicité de Tat  
30

Les résultats présentés aux exemples 3 et 4 démontrent que l'on peut augmenter sensiblement l'immunogénicité de Tat, soit par création d'une zone hydro-

phobe dans la molécule, soit par formation de complexes. Ces deux approches ont été mises en place à partir de deux régions distinctes de Tat. En effet, la formation de complexes avec l'héparine est médiée par la région basique de Tat, localisée du résidu 49 au résidu 57, alors que les 7 cystéines sont regroupées dans la zone 22-37 de la molécule.

En conséquence, des études ont été réalisées pour vérifier dans un premier temps que les molécules Tat de caractère hydrophobe pouvaient toujours interagir avec l'héparine, puis pour déterminer si les composés nouvellement formés présentaient des caractéristiques immunogéniques encore accrues.

L'étude de la liaison de Tat86, Tat86C(22-37)StBu et Tat86C(22-37)L à l'héparine à l'aide d'un test ELISA montre que les trois molécules présentent la même aptitude à lier l'héparine (figure 11).

Après immunisation de souris BALB/c avec Tat86C(22-37)StBu libre ou préalablement complexé à de l'héparine 6000, dans des conditions telles que décrites à l'exemple 3 pour les dérivés de Tat, la réponse anticorps a été analysée en ELISA.

Les titres en anticorps obtenus par immunisation avec le complexe Tat86C(22-37)StBu/Hep6000 sont cinq fois supérieurs à ceux induits par immunisation avec Tat86C(22-37)StBu (figure 12). Ces résultats indiquent que la complexation à l'héparine augmente aussi l'immunogénicité des dérivés de Tat et que la combinaison des deux modifications permet ainsi d'obtenir une augmentation de l'immunogénicité supérieure à celle obtenue avec chacune des modifications, seule.

Des expériences analogues, réalisées chez des souris SWISS et en l'absence d'adjuvant, montrent que la combinaison des deux modifications permet aussi d'obtenir une augmentation de l'immunogénicité supérieure à celle obtenue avec une seule de ces modifications, chez une population non-consanguine, et ce en l'absence d'adjuvant (figure 13).

e) Le dérivé Tat86C(22-37)StBu libre ou complexé à l'héparine induit des cellules T chez l'animal.

Alors que la réponse anticorps anti-Tat joue un rôle crucial dans la limitation de la progression de la maladie, la réponse cellulaire dirigée contre Tat a aussi une place importante dans la protection vis-à-vis de l'infection virale. C'est



pourquoi, l'effet des dérivés hautement immunogènes de Tat sur la réponse cellulaire anti-Tat a été évalué. Les résultats illustrés par la figure 14 montrent que les splénocytes de souris immunisées avec Tat86 ne prolifèrent pas *in vitro* en présence de Tat ce qui indique que l'immunisation avec la forme sauvage de Tat86 ne permet pas d'induire des cellules T spécifiques chez l'animal (figure 14A). En revanche, les splénocytes issus des immunisations avec Tat86C(22-37)StBu (figure 14B) et Tat86C(22-37)StBu/Hep6000 (figure 14C) prolifèrent "*in vitro*" en présence de Tat86, ce qui indique que des cellules T sont bien activées par immunisation à l'aide de ces deux immunogènes.

## 10 **Exemple 5 : Analyse des propriétés transactivatrices des dérivés de Tat**

### 1) Matériels et méthodes

Un plasmide rapporteur, dénommé pLTR-G, comprenant le gène de la protéine fluorescente verte EGFP sous le contrôle transcriptionnel du LTR du VIH-1, a été construit et transfecté de façon stable dans des cellules Hela.

15 De manière plus précise, la séquence du LTR de l'isolat AVR-2 du VIH-1 (Jones et al., Curr. Opin. Cell. Biol., 1993, 5 : 461-468 et numéro d'accès GenBank K02007) couvrant les positions -137 à +58, relativement au site d'initiation de la transcription a été synthétisée selon la méthode décrite dans Stemmer et al., Gene, 1995, 164 : 49-53. Le LTR synthétique ainsi obtenu a été digéré par *HindIII* et  
20 *SacII* et cloné aux mêmes sites du plasmide pEGFP-1 (CLONTECH), en amont du gène EGFP dépourvu de promoteur, pour donner le plasmide pLTR-G.

Une lignée de cellules Hela transfectée de façon stable par le plasmide pLTR-G, et exprimant l'EGFP de façon activable en présence de Tat a été sélectionnée.

25 La lignée de cellules Hela transfectées par le plasmide rapporteur a été incubée en présence de Tat ou de dérivés de Tat préparés comme décrit à l'exemple 1 et de chloroquine (100  $\mu$ M final) dans un milieu sans sérum. Après 3 heures d'incubation à 37 °C, du milieu DMEM contenant 10 % de sérum de veau foetal a été ajouté. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 45 heures à 37°C et la  
30 fluorescence cellulaire a été analysée en cytométrie de flux.

## 2) Résultats

La figure 15 montre que contrairement à Tat101 et Tat86 qui sont capables de transactiver le LTR du VIH, les dérivés de Tat possèdent une activité de transactivation réduite. A l'exception des dérivés Tat101C(22-37)StBu et Tat86 C(22-37)tBu dont l'activité de transactivation est réduite seulement de 60% par rapport à celle de Tat101 ou Tat86, tous les autres dérivés ont un pouvoir transactivateur quasiment aboli (réduction de 95% à 99% par rapport à Tat101 ou Tat86).

### Exemple 6 : Mesure de la résistance de Tat et de ses dérivés vis-à-vis de la dégradation protéolytique

La stabilité protéolytique de Tat et de ses dérivés a été étudiée par analyse de la persistance d'un épitope B (KGLGISYGRK) de la région du core, qui est reconnu par l'anticorps monoclonal dénommé anti-Tat17S, et est particulièrement sensible à la chymotrypsine, du fait qu'il contient trois résidus hydrophobes (L, I et Y). La région core a été sélectionnée pour les raisons suivantes : (i) elle n'est pas modifiée dans l'ensemble des dérivés de Tat étudiés, (ii) elle n'est pas impliquée dans la liaison avec les ligands du type héparine (exemple 3), et (iii) elle n'est pas modifiée dans les dérivés hydrophobes de Tat (exemple 4).

#### 1) Matériels et méthodes

Tat et ses dérivés sont dissous dans un tampon phosphate 50 mM pH 7. 2,5 µg de Tat ou de l'un de ses dérivés sont incubés en présence de tampon phosphate seul ou de tampon phosphate contenant de la chymotrypsine dans un rapport enzyme/substrat de 1/50 (P/P). Après 2 heures à 37°C, la réaction est arrêtée par ajout de PMSF (5 mM final). 300 µl de tampon phosphate pH 7 sont ensuite ajoutés et des dilutions sériées du milieu réactionnel sont distribuées dans les puits d'une plaque ELISA. Après une nuit d'incubation à 4°C, les plaques sont saturées par ajout de 200 µl de tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, contenant 0,3 % de sérum albumine bovine et 0,003 % de thymérosal. Après une heure d'incubation à 37°C, les plaques sont lavées en tampon phosphate de sodium 0,01M pH 7,2 contenant 0,05 % de tween 20. Un liquide d'ascite contenant l'anticorps monoclonal anti-Tat17S spécifique de la région core de Tat est incubé au 1/100 dans les puits des plaques ELISA. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, les plaques sont lavées dans le même tampon que précédemment et un anticorps polyclonal de chèvre

anti-immunoglobuline de souris couplé à la peroxydase est ajouté (dilution 1/5000). Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, les plaques sont lavées dans le même tampon que précédemment et l'ABTS est ajouté dans les puits. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance à 414 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur automatique (Multiskan MCC340, TITERTEK).

La proportion de Tat ayant résisté à l'action de la chymotrypsine est établie comme étant le rapport entre la dilution de Tat en présence de chymotrypsine (Tat chymo) et la dilution de Tat en l'absence de chymotrypsine (Tat en tampon phosphate : Tat tp). Ce rapport est mesuré pour une densité optique égale à 1 après incubation des différents anticorps et du substrat. Ce rapport est mesuré pour l'ensemble des dérivés de Tat (Tat dérivé chymo/Tat dérivé tp). La stabilité du dérivé par rapport à Tat sauvage, est ensuite déterminée par la division du rapport obtenu pour chaque dérivé de Tat, par le rapport mesuré pour Tat sauvage, le tout multiplié par 100 ((Tat dérivé chymo/Tat dérivé tp)/ (Tat sauvage chymo/Tat sauvage tp) x 100). Un pourcentage supérieur à 120 % correspond à une augmentation de stabilité par rapport à Tat sauvage (valeur égale à 100 %).

## 2) Résultats

La sensibilité des dérivés de Tat à la dégradation protéolytique est présentée dans le Tableau I ci-dessous :

**Tableau I : Stabilité des dérivés de Tat vis-à-vis de la digestion par la chymotrypsine**

Dérivés de Tat	Stabilité par rapport à Tat101 ou Tat86
Tat86C(22-37)S	49 %
Tat86C(22-37)StBu	156 %
Tat86C(22-37)L	194 %
Tat86C(22-37)F	210 %
Tat86C(22-37)W	310 %
Tat86/Hep6000	430 %
Tat86/Zn <sup>2+</sup>	167 %
Tat101C(22-37)StBu	132 %
Tat101C(22,34,37)S,C(25,27,30,31)StBu	755 %
Tat101/Hep6000	833 %

Le Tableau I indique que la complexation de Tat à un ligand comme l'héparine, ou bien l'augmentation du caractère hydrophobe de Tat augmentent la stabilité de Tat comme le montre la résistance accrue des dérivés de Tat selon l'invention, vis-à-vis de la dégradation protéolytique. Par comparaison le dérivé 5 contrôle, Tat86Ser qui est substitué par des acides aminés polaires est moins stable que Tat86.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les 10 variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

### REVENDECATIONS

1°) Composition vaccinale anti-VIH, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un antigène Tat stabilisé.

2°) Composition vaccinale selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit antigène Tat stabilisé est constitué par :

a) un complexe entre une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, et un ligand de Tat,

b) une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou modification par un groupement hydrophobe d'au moins un acide aminé de la séquence de Tat, à l'exclusion des substitutions R52L, R55L, R57L et K89L, et

c) un complexe entre la protéine Tat ou le fragment de Tat modifiés en b), et un ligand de Tat.

3°) Composition vaccinale selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit ligand est une héparine ou un fragment d'héparine.

4°) Composition vaccinale selon la revendication 3, caractérisée en ce que ladite héparine est une héparine de poids moléculaire de 15 000 Da ou un fragment d'héparine de poids moléculaire de 6000 Da.

5°) Composition vaccinale selon la revendication 2, caractérisée en ce que ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat sont modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou modification par un groupement hydrophobe de 1 à 7 cystéines, situées en positions 22, 25, 27, 30, 31, 34 et/ou 37.

6°) Composition vaccinale selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'au moins les quatre cystéines en positions 25, 27, 30 et 31 sont substituées par un acide aminé hydrophobe et/ou modifiées par un groupement hydrophobe.

7°) Composition vaccinale selon la revendication 5 ou la revendication 6, caractérisée en ce que ledit acide aminé hydrophobe est sélectionné dans le groupe constitué par : une leucine, un tryptophane et une phénylalanine et/ou ledit groupement hydrophobe est le S-tertio-butyle.

8°) Composition vaccinale selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit antigène Tat stabilisé dérive d'un antigène Tat inactivé.

5 9°) Composition vaccinale selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit antigène Tat inactivé comprend la substitution des cystéines en positions 22, 34 et 37 en sérines.

10 10°) Composition vaccinale selon l'une quelconque des revendications 2 à 9, caractérisée en ce que ledit antigène Tat stabilisé est constitué par un complexe entre la protéine Tat ou le fragment de Tat modifiés, tels que définis à l'une quelconque des revendications 2 et 5 à 9 et un ligand de Tat, tel que défini à l'une quelconque des revendications 2 à 4.

15 11°) Composition vaccinale selon l'une quelconque des revendications 2 à 10, caractérisée en ce que ladite protéine Tat ou le fragment de ladite protéine sont choisis parmi : la protéine Tat de 86 acides aminés, le fragment 1 à 57 de Tat et les fragments d'au moins 11 acides aminés inclus dans la protéine ou le fragment précédents.

20 12°) Composition vaccinale selon l'une quelconque des revendications 2 à 11, caractérisée en ce que ledit antigène Tat stabilisé dérive de la protéine Tat de séquence SEQ ID NO : 1 ou d'un fragment d'au moins 11 acides aminés de cette séquence.

13°) Composition vaccinale selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat sont des monomères.

25 14°) Composition vaccinale selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat sont des oligomères, de préférence des dimères.

30 15°) Composition vaccinale selon la revendication 14, caractérisée en ce que lesdits oligomères, de préférence dimères, sont formés de l'association covalente de ladite protéine Tat et/ou du fragment de ladite protéine par l'intermédiaire d'une liaison disulfure intermoléculaire impliquant l'une des cystéines en position 22, 25, 27, 30, 31, 34 ou 37.

16°) Composition vaccinale selon la revendication 15, caractérisée en ce que ladite liaison disulfure implique l'une des cystéines en position 22, 34 ou 37.

17°) Composition vaccinale selon la revendication 14, caractérisée en ce que lesdits oligomères, de préférence dimères, sont formés de l'association non-  
5 covalente de ladite protéine Tat et/ou du fragment de ladite protéine par l'intermédiaire d'ions polyvalents, de préférence divalents comme notamment le zinc et le cadmium.

18°) Composition vaccinale selon la revendications 16, caractérisée en ce que le dimère de Tat est formé de l'association par un pont disulfure entre les  
10 cystéines en position 34, de deux protéines Tat ou de deux fragments de Tat d'au moins 11 acides aminés comprenant une sérine en positions 22 et 37 et une leucine en positions 25, 27, 30 et 31.

19°) Composition vaccinale selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement  
15 acceptable, et/ou un adjuvant, et/ou une substance porteuse.

20°) Composition vaccinale selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un antigène stabilisé tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 18 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable et/ou une substance porteuse.

21°) Composition vaccinale selon la revendication 19, caractérisée en ce que ledit adjuvant est l'hydroxyde d'alumine.

22°) Antigène Tat stabilisé tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 18 comme vaccin pour la prévention et/ou le traitement d'une infection par le VIH chez l'Homme.

23°) Utilisation d'un antigène Tat stabilisé tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 18, pour la préparation d'un vaccin destiné à la prévention et/ou au traitement d'une infection par le VIH chez l'Homme.

24°) Complexe peptidique, caractérisé en ce qu'il est constitué par :

- une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11  
30 acides aminés, modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou modification par un groupement hydrophobe d'au moins un acide aminé de la séquence de Tat, tels que définis à l'une quelconque des revendications 2 et 5 à 18, associé à

- un ligand de Tat, tel que défini à l'une quelconque des revendications 2 à 4.

25°) Protéine ou fragment peptidique, caractérisés en ce qu'ils sont choisis parmi une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou modification  
5 par un groupement hydrophobe d'au moins un acide aminé de la séquence de Tat, tels que définis à l'une quelconque des revendications 2 et 5 à 18, à l'exclusion des substitutions R52L, R55L, R57L et K89L.

26°) Procédé de préparation d'un antigène Tat stabilisé, caractérisé  
10 en ce qu'il comprend au moins :

- la préparation, par tout moyen approprié, d'une protéine Tat de VIH ou d'un fragment de Tat tels que définis à l'une quelconque des revendications 2, 8, 9 et 11 à 18, et de façon simultanée ou séquentielle,

- la formation d'un complexe avec un ligand de Tat tel que défini à  
15 l'une quelconque des revendications 2 à 4 et/ou la substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou la modification par un groupement hydrophobe, d'au moins un des résidus d'acides aminés de la séquence de Tat, telles que définies à l'une quelconque des revendications 2 et 5, 6, 7, 10 et 18, à l'exclusion des substitutions R52L, R55L, R57L et K89L.

20 27°) Polynucléotide ou mélange de polynucléotides sélectionné dans le groupe constitué par :

a) un polynucléotide ou un mélange de polynucléotides comprenant la séquence codant pour une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés tels que définis à l'une quelconque des revendications 2  
25 et 5 à 18 et la séquence codant pour un ligand peptidique de Tat, et

b) un polynucléotide comprenant la séquence codant pour une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe d'au moins un acide aminé de la séquence de Tat tels que définis à l'une quelconque des revendications 2 et 5 à 18, à l'exclusion  
30 des substitutions R52L, R55L, R57L et K89L.

28°) Vecteur recombinant comprenant le polynucléotide tel que défini en a) ou en b) de la revendication 27.



29°) Mélange de vecteurs recombinants comprenant chacun des polynucléotides du mélange tel que défini en a) de la revendication 27.

30°) Cellule eucaryotes modifiées par un polynucléotide, un vecteur recombinant ou un mélange tels que définis à l'une quelconque des revendications 27  
5 à 29.

1/15

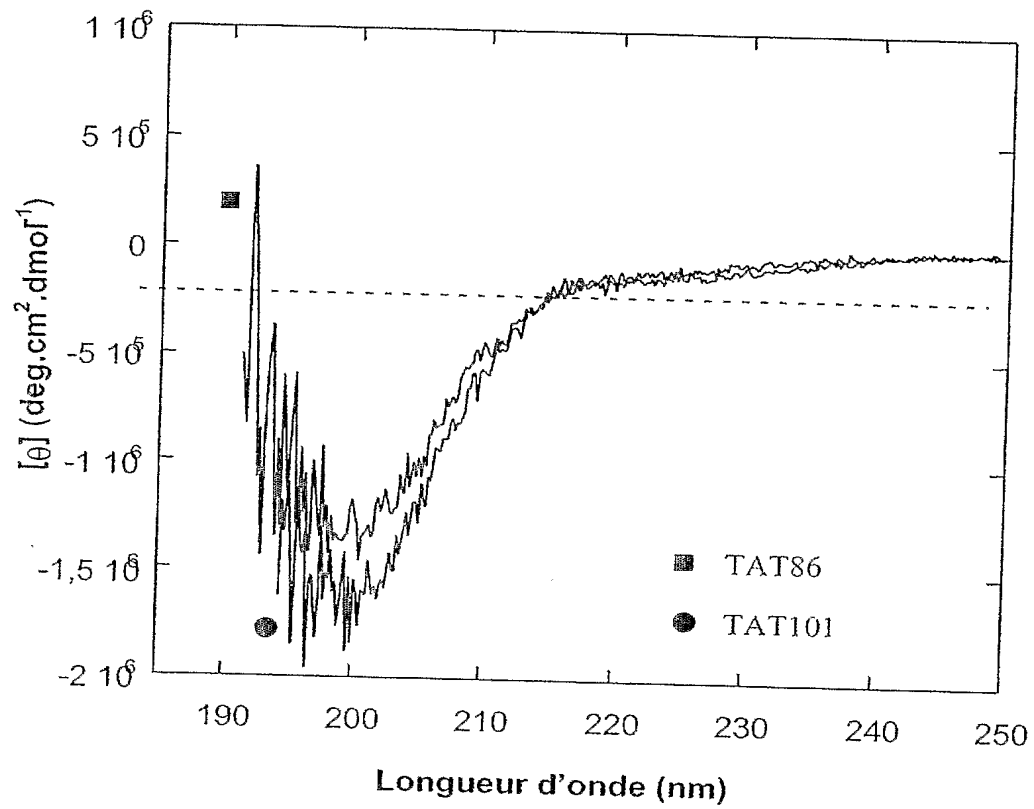


Figure 1

2/15

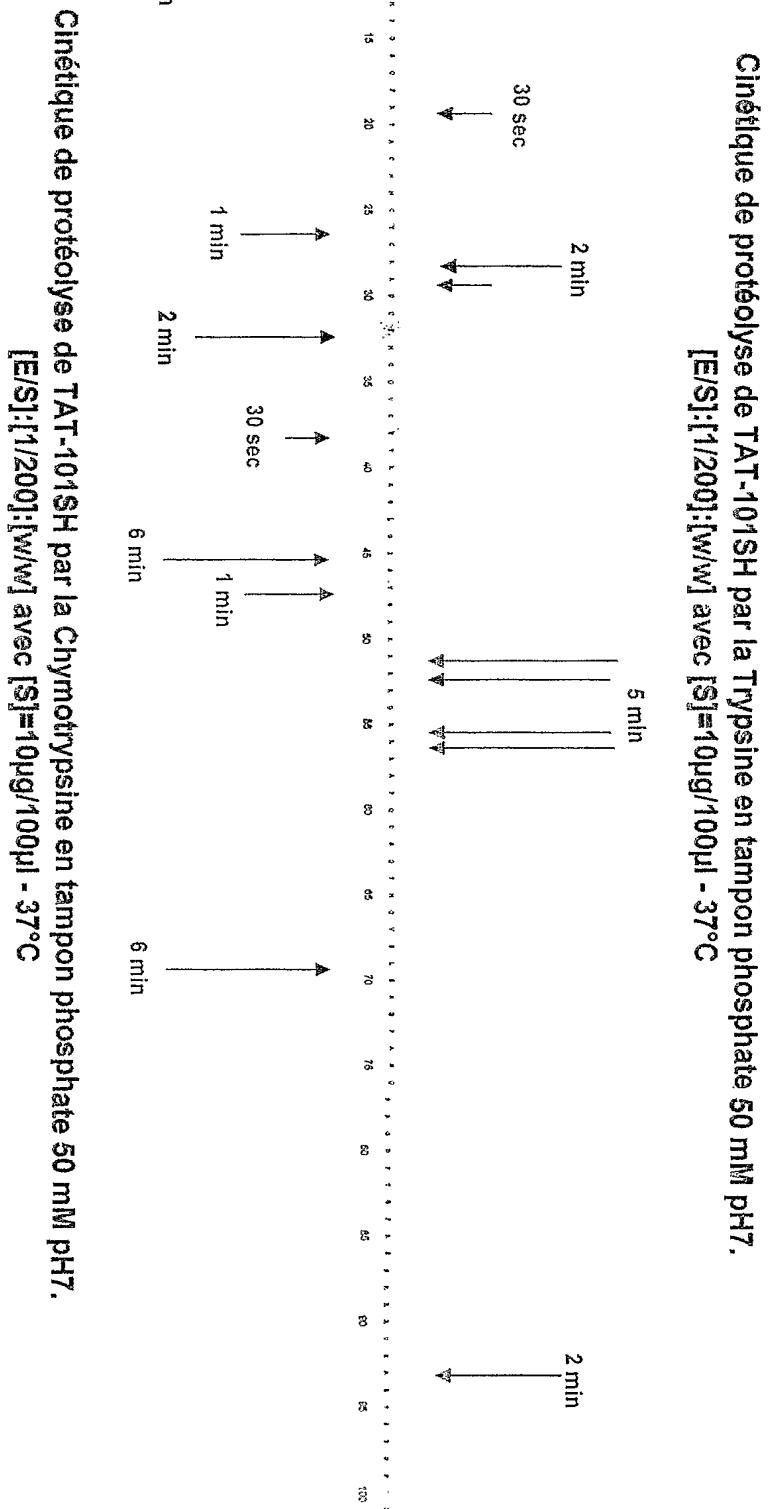


Figure 2

3/15

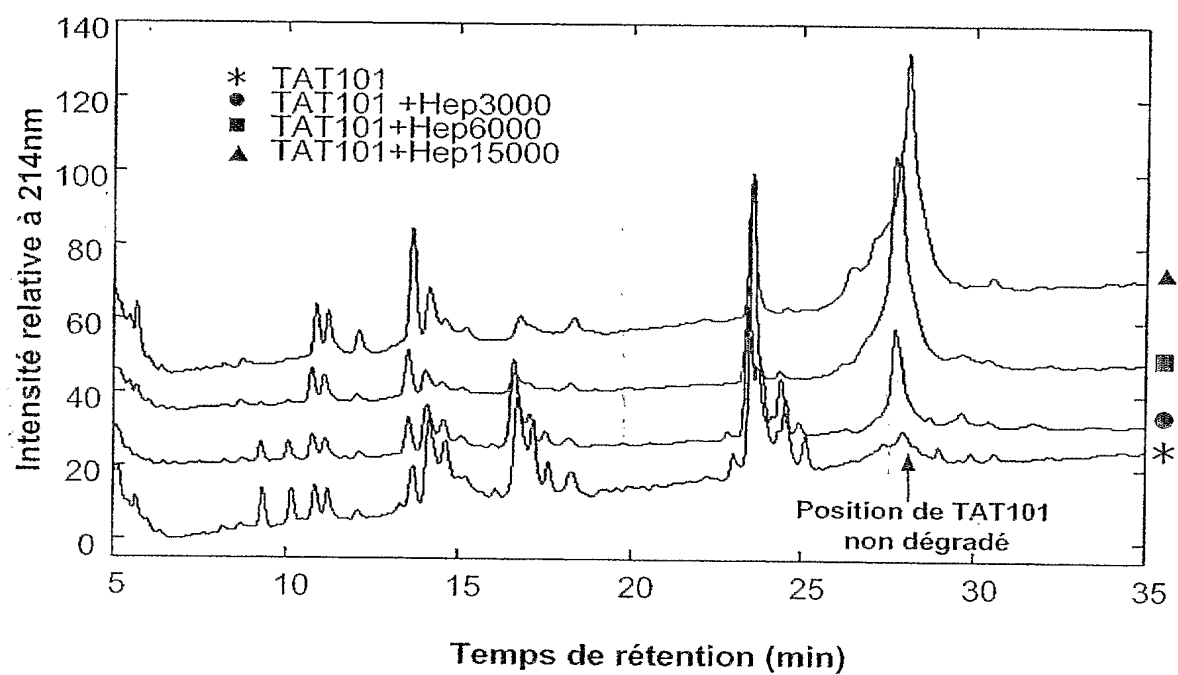


Figure 3

4/15

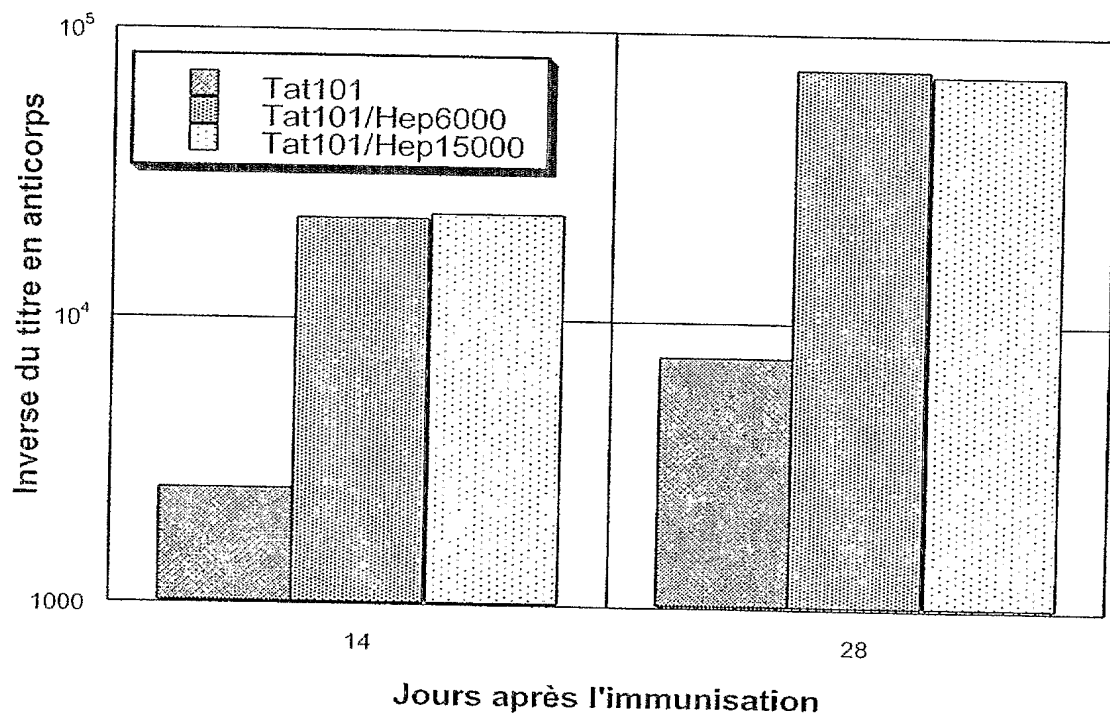


Figure 4

5/15

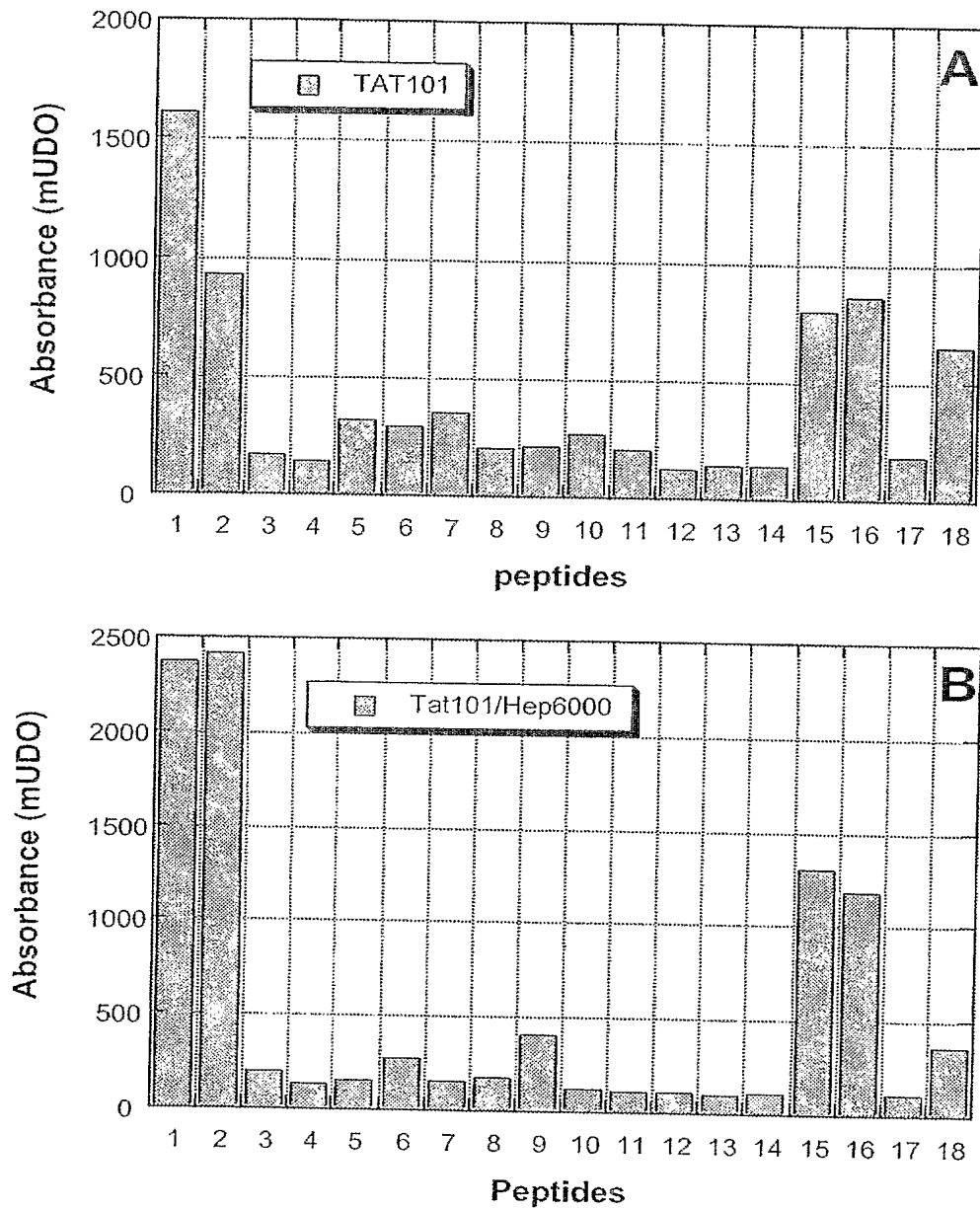


Figure 5

6/15

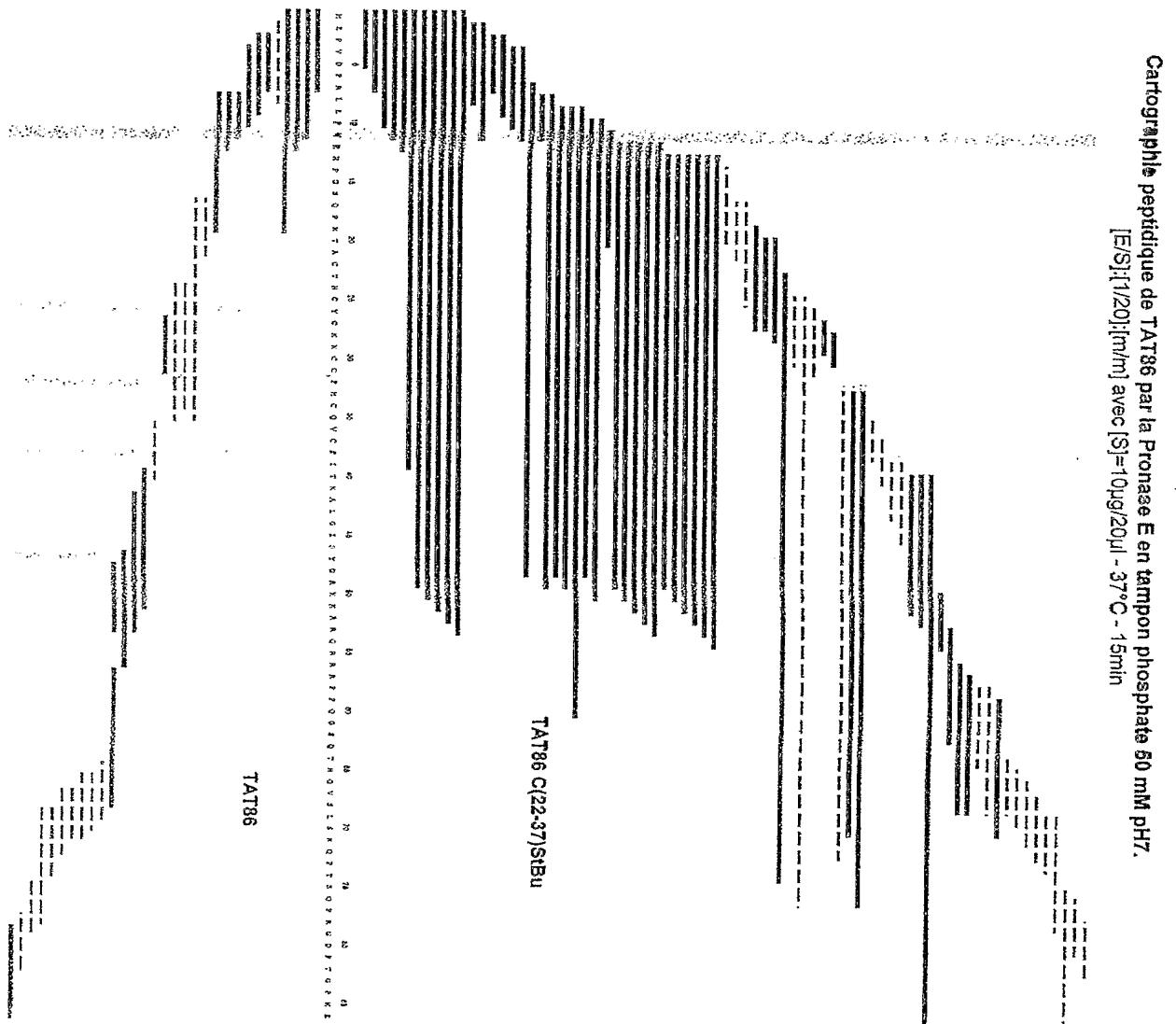


Figure 6

7/15

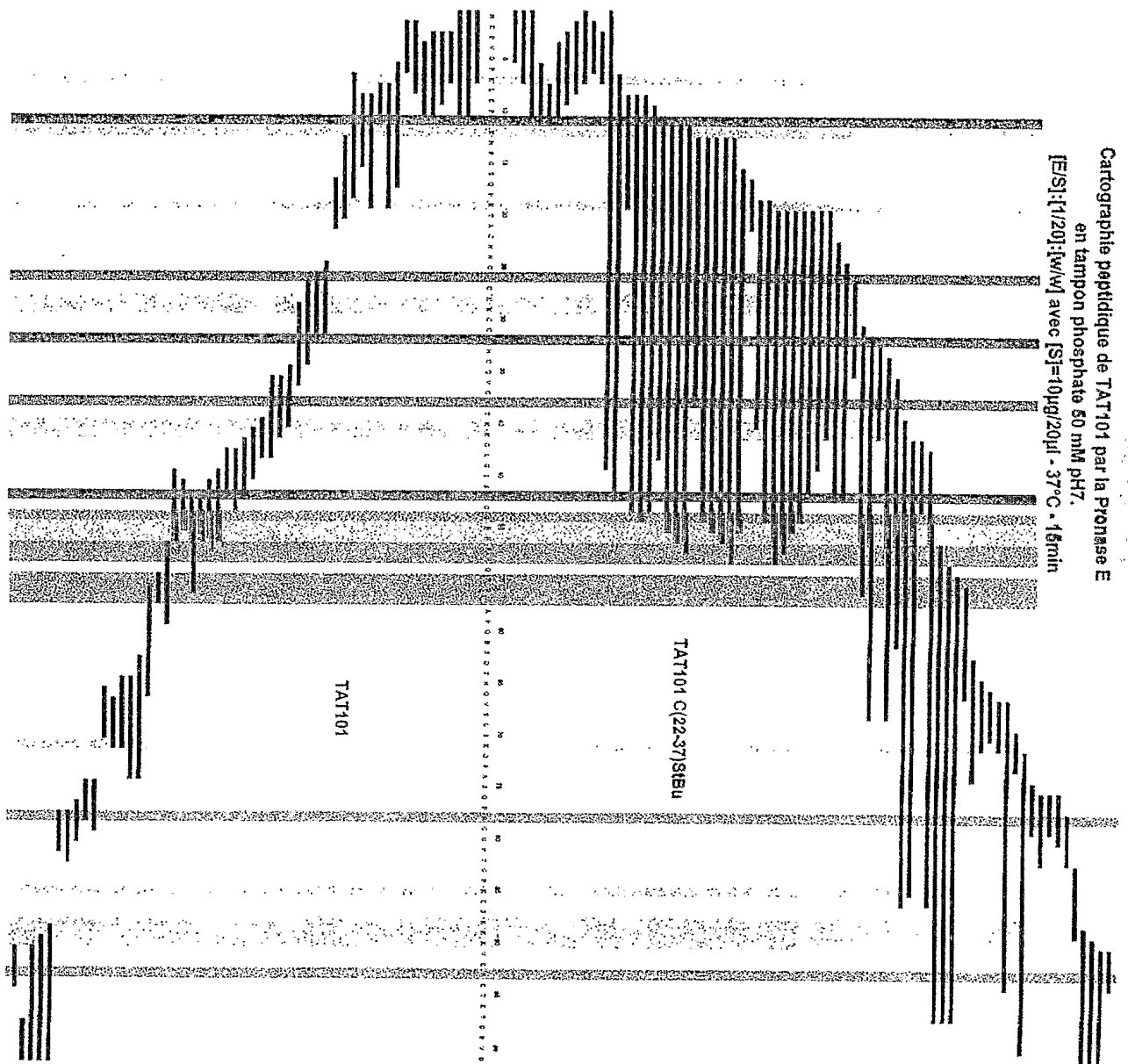


Figure 7



8/15

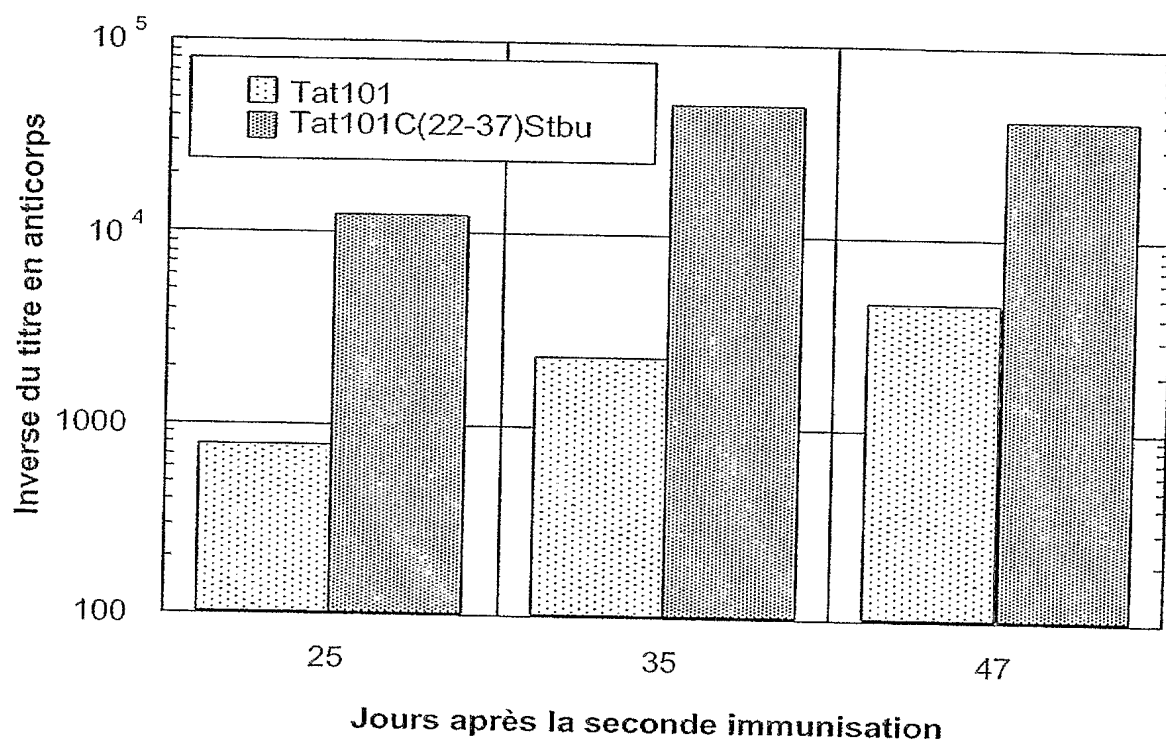


Figure 8

9/15

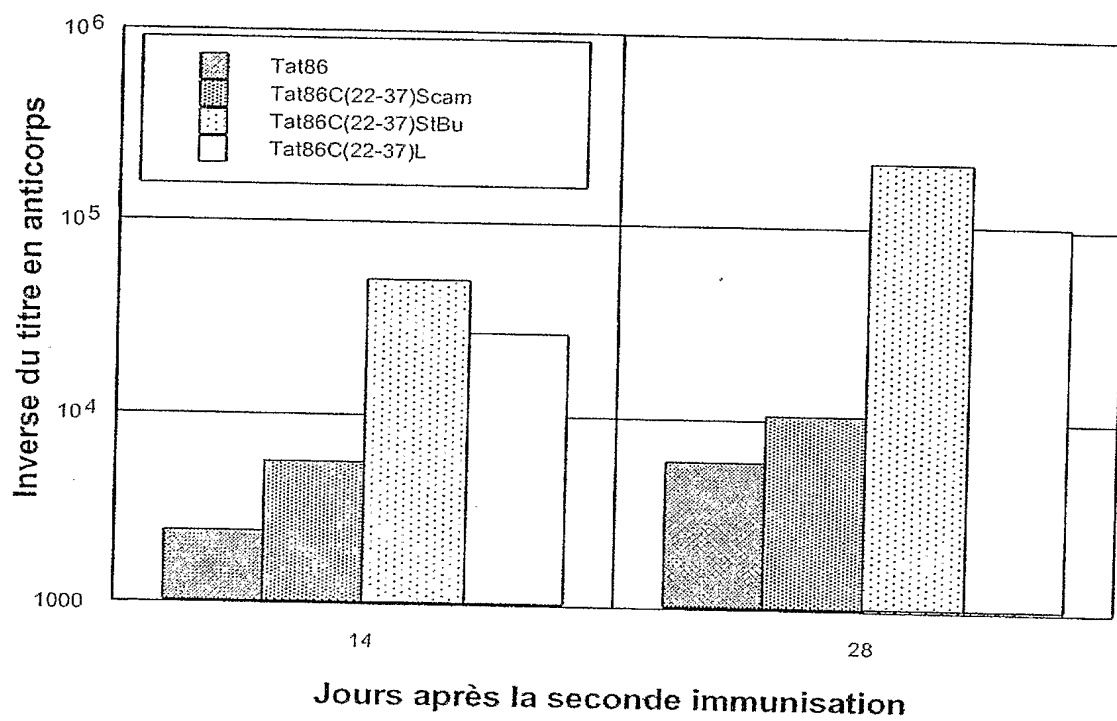


Figure 9

10/15

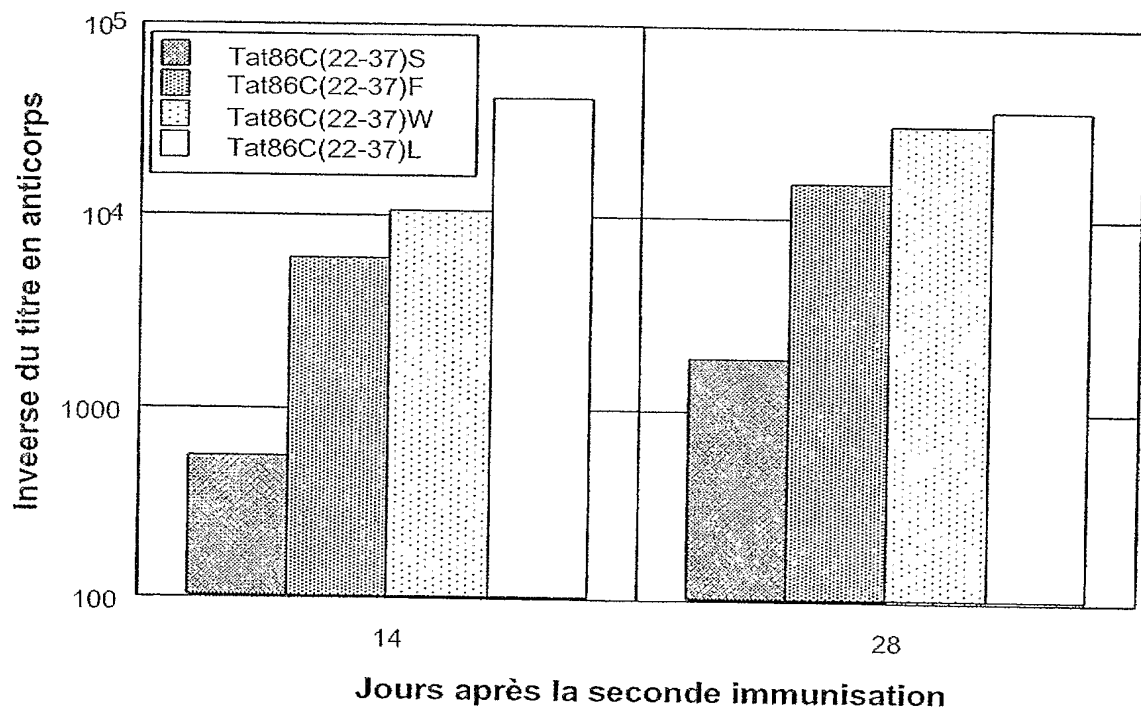


Figure 10

11/15

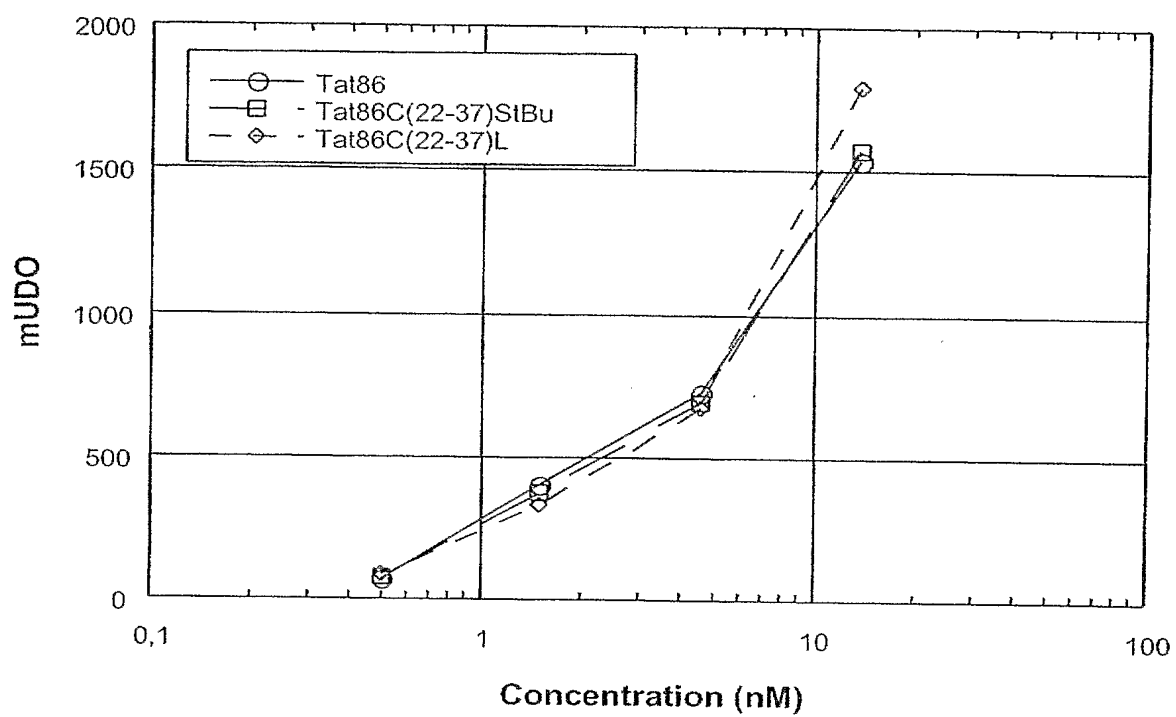


Figure 11

12/15

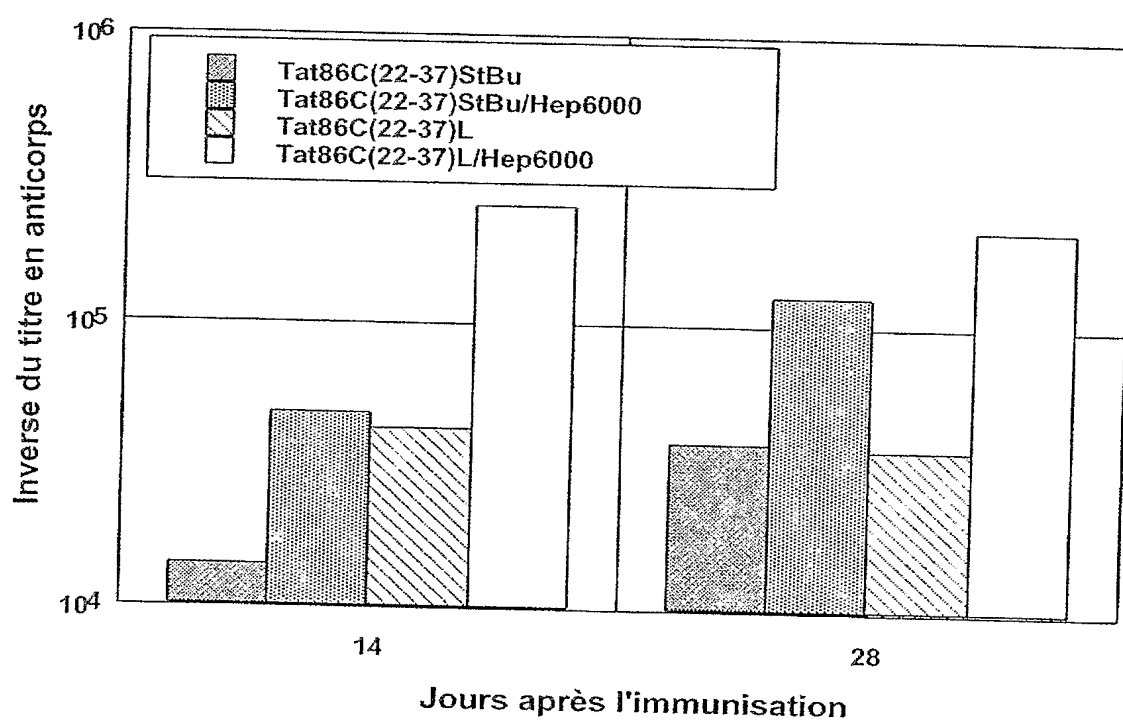


Figure 12

13/15

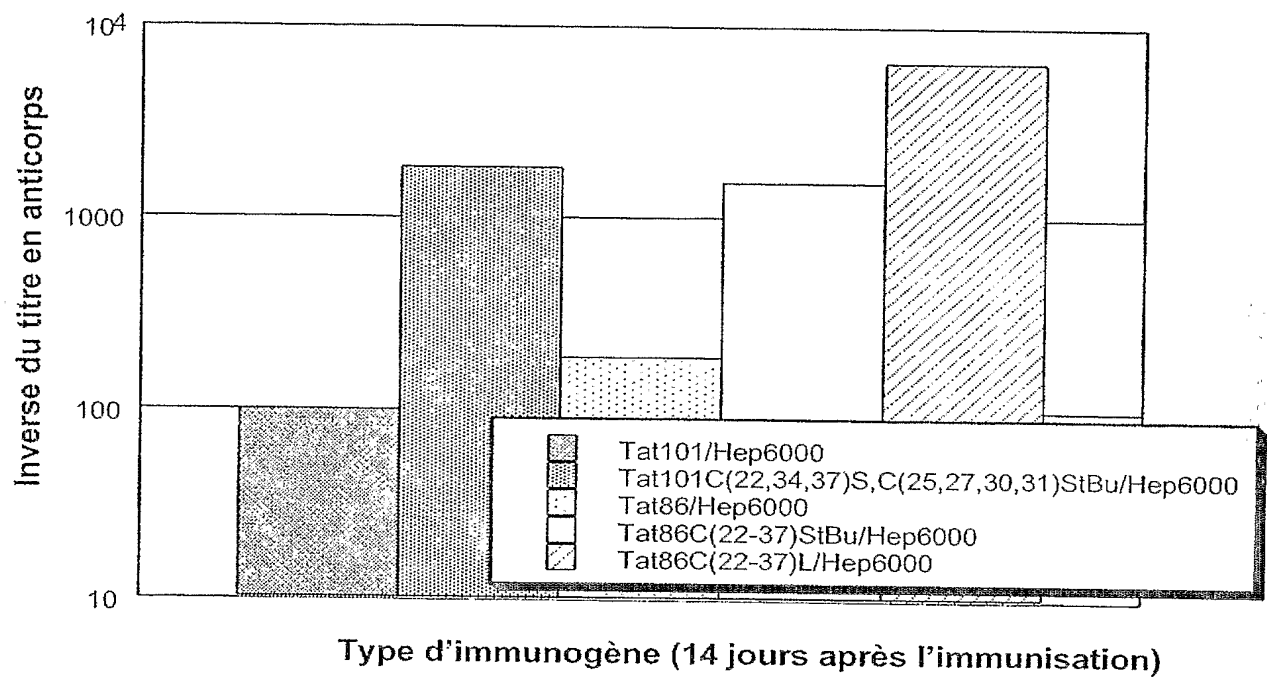


Figure 13

14/15

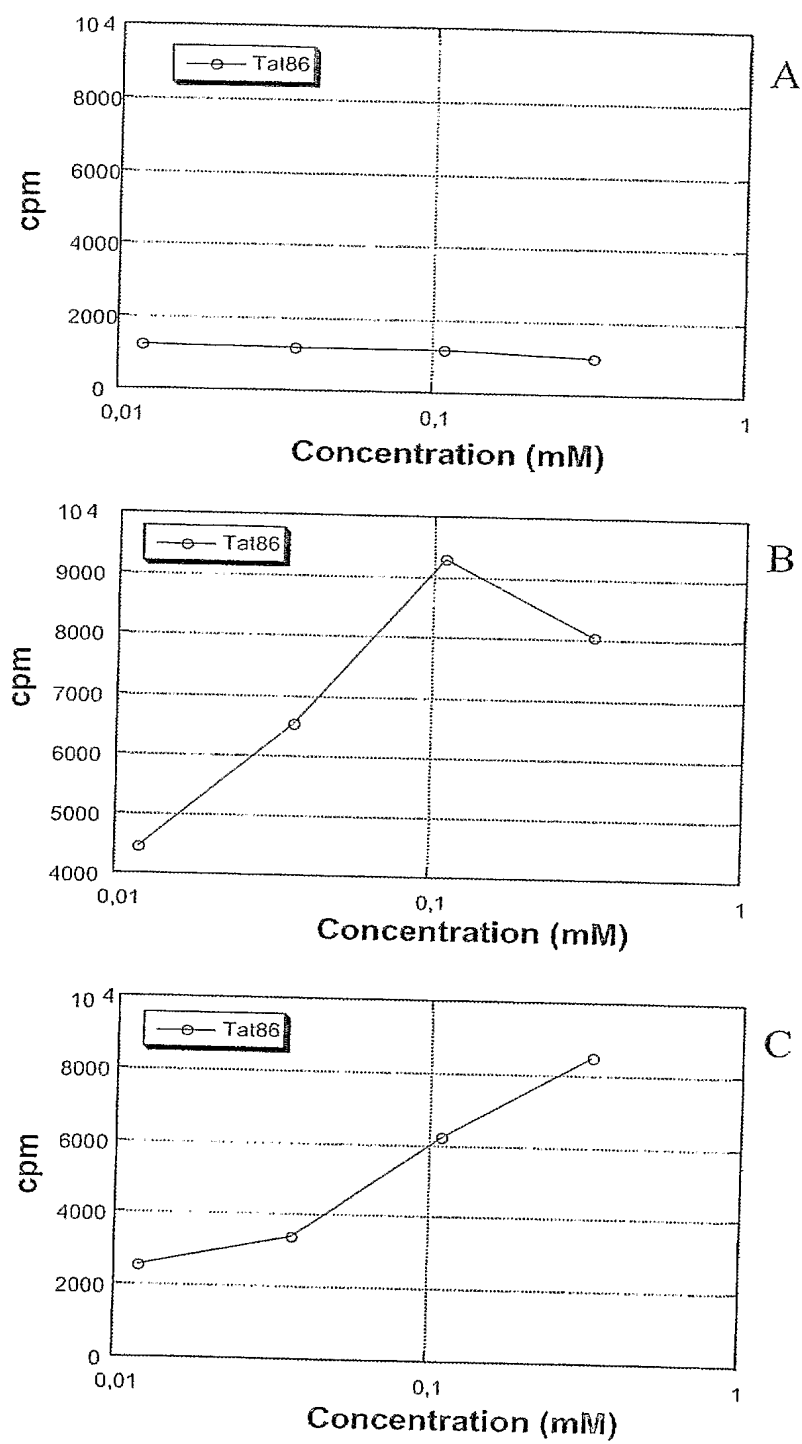


Figure 14

15/15

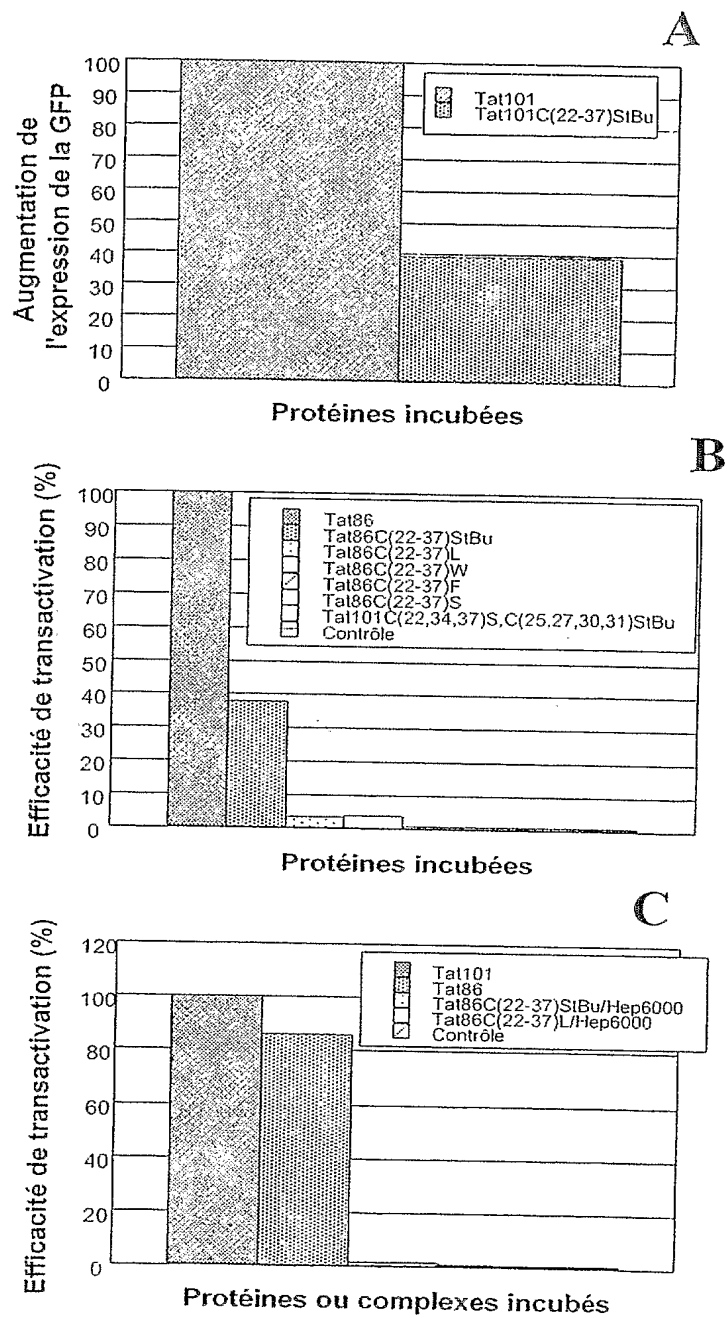


Figure 15



s263FR110.ST25  
SEQUENCE LISTING

<110> Commissariat à l'Energie Atomique

<120> Antigène Tat stabilisé et ses applications pour la vaccination anti-VIH

<130> s263FR110

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 101

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa= Norleucine

<400> 1

Xaa Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe  
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly  
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Pro Gln Asp Ser Gln Thr  
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu  
85 90 95

1er dépôt

s263FR110.ST25

Thr Asp Pro Val Asp  
100



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

0 825 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

## BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*03

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.. / 3..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

INV

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 113 W / 210103

Vos références pour ce dossier (facultatif)	BLO/HLPnd F263/110 FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0403425

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

ANTIGENE TAT STABILISE ET SES APPLICATIONS POUR LA VACCINATION ANTI-VIH.

## LE(S) DEMANDEUR(S) :

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE  
31-33, rue de la Fédération  
75015 PARIS  
FRANCE

## DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

1 Nom		DREVET
Prénoms		Pascal
Adresse	Rue	30, rue Ernest Cousseran
	Code postal et ville	19 114 710 LIMOURS
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		LAJEUNESSE
Prénoms		Evelyne
Adresse	Rue	16, Avenue Fernand Fenzy
	Code postal et ville	91 211 610 ANTONY
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		LECOQ
Prénoms		Alain
Adresse	Rue	9, Place des rouges gorges
	Code postal et ville	91 115 14 10 MENNECY
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)  
DU (DES) DEMANDEUR(S)  
OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

Paris, le 1er Avril 2004

ORES Beatrice

N° 92-4046 - Mandataire CABINET ORES



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

**0 825 83 85 87**  
0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*03

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 2../3..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 210103

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		BLO/HLPnd F263/110 FR
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0603625
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
ANTIGENE TAT STABILISE ET SES APPLICATIONS POUR LA VACCINATION ANTI-VIH.		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31-33, rue de la Fédération 75015 PARIS FRANCE		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	Nom	LEONETTI
	Prénoms	Michel
Adresse	Rue	6, rue Claude Monet
	Code postal et ville	19 11 61 21 01 NOZAY
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2</b>	Nom	MENEZ
	Prénoms	André
Adresse	Rue	102, rue Claude Nicolas Ledoux, Cressely
	Code postal et ville	17 18 11 11 14 MAGNY LES HAMEAUX
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b>	Nom	MOINE
	Prénoms	Gervaise
Adresse	Rue	40, rue Gérard de Nerval
	Code postal et ville	17 18 11 18 10 MONTIGNY LE BRETONNEUX
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
Paris, le 1er Avril 2004 ORES Beatrice N° 92-4046 - Mandataire CABINET ORES		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

0 825 83 85 87  
0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

## BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*03

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 3.. / 3..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 210103

Vos références pour ce dossier (facultatif)	BLO/HLPnd F263/110 FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0603122
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)	

ANTIGENE TAT STABILISE ET SES APPLICATIONS POUR LA VACCINATION ANTI-VIH.

## LE(S) DEMANDEUR(S) :

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE  
31-33, rue de la Fédération  
75015 PARIS  
FRANCE

## DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

1	Nom	THAI
	Prénoms	Robert
	Adresse	Rue
		6, rue Paul Cézanne
		Code postal et ville
		91162 NOZAY
	Société d'appartenance (facultatif)	
2	Nom	
	Prénoms	
	Adresse	Rue
		Code postal et ville
	Société d'appartenance (facultatif)	
3	Nom	
	Prénoms	
	Adresse	Rue
		Code postal et ville
	Société d'appartenance (facultatif)	

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)

DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

Paris, le 1er Avril 2004

ORES Beatrice

N° 92-4046 - Mandataire CABINET ORES



